

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA

Caracterización de la resistencia a los carbapenémicos de *Acinetobacter*
spp. a partir de aislados clínicos y ambientales de la ciudad de
Quito, Ecuador, 2016.

NICOLE ELIZABETH SOTOMAYOR ÁVILA

DIRECTORA: MSc. Rosa de los Ángeles Bayas-Rea

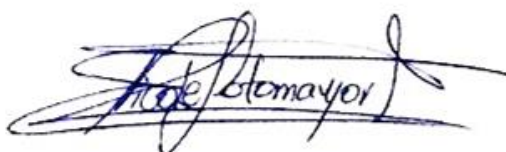
QUITO, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, NICOLE ELIZABETH SOTOMAYOR ÁVILA, C.I. 1725626103, autora del trabajo de graduación intitulado: “CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS CARBAPENÉMICOS DE *Acinetobacter* spp. A PARTIR DE AISLADOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE LA CIUDAD DE QUITO, ECUADOR, 2016” previa a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGA en la Escuela de Bioanálisis:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 01 de agosto del 2016

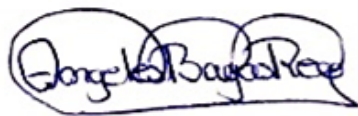


Srta. Nicole Elizabeth Sotomayor Ávila

C.I. 1725626103

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Microbiología de la Srta. Nicole Elizabeth Sotomayor Ávila sobre el tema “Caracterización de la resistencia a los carbapenémicos de *Acinetobacter* spp. a partir de aislados clínicos y ambientales de la ciudad de Quito, Ecuador, 2016” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Rosa de los Angeles Bayas-Rea'.

Rosa de los Ángeles Bayas-Rea, MSc.

Directora de la Disertación

Quito, 01 de agosto del 2016

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mi familia, especialmente, a mis padres.

A mis amigos cercanos.

A la PUCE.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por sus bendiciones y por permitirme culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A toda mi familia, que tanto quiero, por su apoyo y preocupación. En particular, a mis padres y hermano por el amor que me brindan cada día, especialmente, a mi madre por apoyarme en todos mis propósitos y que gracias a su ejemplo he llegado a ser lo que soy. Un agradecimiento especial, a mi abuelita y primo José Luis que colaboraron con el muestreo de los aislados ambientales.

Muchas gracias a Rosita Bayas-Rea porque desde el primer momento me apoyó con el desarrollo del presente trabajo, por la amistad brindada y porque me ha enseñado el verdadero significado de ética y de un trabajo de calidad.

Agradezco a mis lectores, Eduardo Villacis y Nadia López, por las correcciones y valiosas sugerencias para mejorar el presente trabajo. Gracias a Lucía Ulloa, Sandra Andrade y al Dr. Roberto Díaz por brindarme todo su apoyo y facilidades en el proceso previo a la defensa de grado.

Gracias al Laboratorio de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública; en particular, al Dr. Jorge Reyes por permitir el acceso a los aislados clínicos y las facilidades para poder desarrollar la parte práctica. Agradezco de manera especial a Eduardo Villacis por su gran ayuda y apoyo desde el primer momento para el desarrollo del presente trabajo, así como, también a todos quienes conformar el equipo de trabajo del mencionado instituto.

Agradezco al Ing. Julio Sánchez por su asesoramiento en la parte estadística. Gracias al Dr. Rommel Montúfar por permitir el acceso a su laboratorio para llevar a cabo tanto la parte práctica de los aislados ambientales como la parte escrita del presente estudio.

A mi novio y mis amigos más cercanos por el cariño y apoyo que me han brindado todo el tiempo.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	3
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes	6
2.2. Infecciones Asociadas a la Atención en Salud	7
2.3. <i>Acinetobacter</i> spp.	10
2.3.1. Generalidades	10
2.3.2. Epidemiología	12
2.4. Antibióticos	14

2.4.1. Betalactámicos	15
2.4.1.1. Carbapenémicos	15
2.5. Carbapenemasas	16
2.5.1. Serin- β -lactamasas	17
2.5.1.1. Clase A	18
2.5.1.2. Clase D	19
2.5.2. Metalo- β -lactamasas	21
2.6. Mecanismos de resistencia	23
2.6.1. Mecanismos de resistencia intrínsecos	25
2.6.1.1. Alteración de la permeabilidad	25
2.6.1.2. Bombas de eflujo	26
2.6.1.3. Hidrólisis enzimática	29
2.6.2. Mecanismos de resistencia adquiridos	30
2.6.2.1. Mutaciones	31
2.6.2.2. Transferencia horizontal de genes	33
2.6.2.2.1. Plásmidos	34
2.6.2.2.2. Integrones	35
2.6.2.2.3. Transposones	36
2.7. Identificación de resistencia antibiótica	37
2.7.1. Detección fenotípica de la resistencia antibiótica	37
2.7.2. Detección molecular de la resistencia antibiótica	39
2.8. Análisis filogenéticos	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1. Tipo de estudio	44

3.2. Procedencia de las muestras	44
3.2.1. Aislados clínicos	44
3.2.2. Colección de muestras ambientales	44
3.3. Control de calidad	45
3.3.1. Control de calidad de los medios de cultivo	45
3.3.2. Control de calidad de los discos	47
3.4. Aislamiento e identificación de <i>Acinetobacter</i> spp.	47
3.5. Pruebas de sensibilidad	48
3.6. Análisis molecular	49
3.6.1. Extracción de ADN	49
3.6.2. Amplificación de los genes de resistencia	49
3.6.3. Purificación y secuenciamiento de las muestras	51
3.7. Análisis de datos	52
3.7.1. Análisis estadístico	52
3.7.2. Análisis filogenéticos	52
4. RESULTADOS	55
4.1. Aislamiento e identificación microbiológica de <i>Acinetobacter</i> spp.	55
4.1.1. Aislados clínicos	55
4.1.2. Aislados ambientales	57
4.2. Evaluación de susceptibilidad antibiótica	61
4.2.1. Aislados clínicos	61
4.2.2. Aislados ambientales	62
4.3. Cuantificación de ADN	64
4.4. Amplificación de los genes de resistencia	64

4.4.1. Aislados clínicos	64
4.4.2. Aislados ambientales	67
4.4.3. Análisis estadísticos	68
4.5. Análisis de las secuencias de los genes de resistencia	68
4.5.1. Identificación de los genes de resistencia de aislados clínicos	68
4.5.2. Identificación de los genes de resistencia de aislados ambientales	71
4.6. Relaciones filogenéticas de cuatro genes de resistencia <i>bla</i> _{OXA}	75
5. DISCUSIÓN	78
5.1. Aislamiento e identificación de <i>Acinetobacter</i> spp.	78
5.1.1. <i>Acinetobacter</i> spp. en aislados clínicos	78
5.1.2. Aislamiento e identificación de <i>Acinetobacter</i> spp. de muestras ambientales	80
5.2. Susceptibilidad antibiótica de <i>Acinetobacter</i> spp.	86
5.3. Genes de resistencia de las serin-β-lactamasas de <i>Acinetobacter</i> spp. procedentes de aislados clínicos	92
5.3.1. Gen de resistencia <i>bla</i> _{OXA-23} presente en <i>Acinetobacter</i> spp.	92
5.3.2. Gen de resistencia <i>bla</i> _{OXA-51} presente en <i>Acinetobacter</i> spp.	94
5.3.3. Gen de resistencia <i>bla</i> _{OXA-143} presente en <i>Acinetobacter</i> spp.	95
5.3.4. Gen de resistencia <i>bla</i> _{OXA-72} presente en <i>Acinetobacter</i> spp.	97
5.3.5. Gen de resistencia <i>bla</i> _{OXA-58} presente en <i>Acinetobacter</i> spp.	99
5.3.6. Gen de resistencia <i>bla</i> _{GES} en <i>Acinetobacter</i> spp.	101
5.4. Genes de resistencia de las metalo-β-lactamasas en <i>Acinetobacter</i> spp.	101
5.5. Genes de resistencia presentes en <i>Acinetobacter</i> spp. de aislados ambientales..	104

5.6. Relaciones filogenéticas de cuatro genes de resistencia <i>bla</i> _{OXA}	106
6. CONCLUSIONES	108
7. RECOMENDACIONES	111
8. REFERENCIAS	113
9. ANEXOS	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Tipo de muestras clínicas de los diferentes aislados de <i>Acinetobacter</i> spp. con respecto al total de pacientes	55
Figura 2.	Servicio de muestras clínicas de los diferentes aislados de <i>Acinetobacter</i> spp. con respecto al total de pacientes	56
Figura 3.	Caracterización morfológica de aislados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. de cuatro hospitales de la ciudad de Quito	57
Figura 4.	Crecimiento de diferentes bacterias en medio <i>CHROM AGAR</i> <i>Acinetobacter</i> encontradas en cinco ríos de la ciudad de Quito	57
Figura 5.	Caracterización morfológica de aislados ambientales de <i>Acinetobacter</i> spp. provenientes de cuatro ríos de la ciudad de Quito	58
Figura 6.	Perfil de resistencia de aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito	61
Figura 7.	Sinergia con EDTA y ácido borónico de aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito	62
Figura 8.	Porcentaje de susceptibilidad de aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito	63
Figura 9.	Sinergia con EDTA y ácido borónico de aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito	63
Figura 10.	Representación de la amplificación del gen <i>bla_{GIM}</i> para los aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito	65
Figura 11.	Representación del tamaño del producto de PCR de ocho genes amplificados de diferentes aislados clínicos	65

Figura 12.	Porcentajes de los diferentes genes de resistencia encontrados en los aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito	66
Figura 13.	Tamaño del producto de PCR del gen <i>bla_{OXA-51}</i> de diez aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito	67
Figura 14.	Alineamiento de los haplotipos del gen <i>bla_{OXA-51}</i> provenientes de aislados clínicos y ambientales de la ciudad de Quito	73
Figura 15.	Alineamiento de la secuencia del gen <i>bla_{OXA-143}</i> proveniente del aislado clínico 15-1175 de la ciudad de Quito	74
Figura 16.	Relaciones filogenéticas con cuatro genes de la clase D de las serin- β -lactamasas de 333 pb	76
Figura 17.	Relaciones filogenéticas con cuatro genes de la clase D de las serin- β -lactamasas de 205 pb	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Aislamiento e identificación de los aislados ambientales provenientes de cinco ríos	59
Tabla 2.	Identificación de los genes de resistencia de aislados clínicos y ambientales.....	72

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Datos de los aislados clínicos obtenidos del INSPI-Quito periodo enero-diciembre 2015	164
Anexo 2.	Protocolo de <i>Global Sewage Surveillance Project</i>	168
Anexo 3.	Datos de muestras ambientales colectadas de cinco ríos de la ciudad de Quito-Ecuador 2016	169
Anexo 4.	Puntos de corte de los antibióticos empleados en el presente estudio de acuerdo a los lineamientos del CLSI	171
Anexo 5.	Lista de <i>primers</i> empleados en el presente estudio	172
Anexo 6.	Secuencias obtenidas del <i>GenBank</i> utilizadas para los análisis filogenéticos de cuatro genes de resistencia <i>bla_{OXA}</i>	173
Anexo 7.	Perfil de susceptibilidad de los diferentes aislados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp.	176
Anexo 8.	Perfil de susceptibilidad de los diferentes aislados de <i>Acinetobacter</i> spp. obtenidos de cuatro ríos de la ciudad de Quito	180
Anexo 9.	Cuantificación de ADN de aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito	182
Anexo 10.	Cuantificación de ADN de aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito	184
Anexo 11.	Genes de resistencia identificados en los diferentes aislados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp.	184
Anexo 12.	Genes de resistencia identificados en los diferentes aislados ambientales de <i>Acinetobacter</i> spp.	188

RESUMEN

Acinetobacter spp. son considerados como patógenos oportunistas responsables de infecciones asociadas a la atención de la salud. Las especies del género *Acinetobacter* se caracterizan por presentar una alta resistencia a los carbapenémicos; por lo que, se han convertido en un mayor problema de salud pública a nivel mundial. El presente estudio tuvo como objetivo principal caracterizar la resistencia a los carbapenémicos de *Acinetobacter* spp. a partir de aislados clínicos y ambientales de la ciudad de Quito.

Para el estudio, se incluyó aislados clínicos provenientes del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, los mismos que fueron reactivados en agar sangre de cordero. Por otro lado, se colectó muestras ambientales de cinco ríos, Machángara, Monjas, Pita, San Pedro y Guayllabamba, las mismas que fueron sembradas en el medio selectivo *CHROM AGAR* para el aislamiento de *Acinetobacter* spp. La identificación de los aislados ambientales se realizó mediante pruebas automatizadas (*VITEK-2*) y bioquímicas como catalasa, oxidasa y motilidad. Los aislados clínicos y ambientales fueron sujetos a la prueba de sensibilidad antibiótica mediante el método de difusión en disco en agar *Muller Hinton*; para lo cual, se usaron doce antibióticos de acuerdo a las recomendaciones del Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos. Para la determinación fenotípica de las enzimas metalo- β -lactamasas y serin- β -lactamasas se realizó la prueba de monodiscos de EDTA y ácido borónico, respectivamente. Por otro lado, el análisis molecular consistió en extracción del ADN mediante ebullición, amplificación y secuenciación de nueve genes de resistencia a los carbapenémicos, seis genes que codifican para las serin- β -lactamasas, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* y *bla_{OXA-143}* y tres que codifican para las metalo- β -lactamasas, *bla_{SPM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{GIM}*. Finalmente, las relaciones filogenéticas de los genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-143}* fueron evaluadas mediante inferencia bayesiana.

Como resultado, en los aislados ambientales se identificó principalmente *Acinetobacter baumannii* y el complejo *A. calcoaceticus/A. baumannii*; de los cuales, el 50 % de los aislados fueron resistentes a imipenem. Por otro lado, todos los aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. presentaron una alta resistencia a imipenem y meropenem. Además, los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51} fueron los más predominantes en aislados clínicos; mientras que, el gen *bla*_{OXA-51} fue el más frecuente en aislados ambientales. De acuerdo a los análisis estadísticos, no se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los genes *bla*_{OXA-51} provenientes de aislados clínicos y ambientales. En base a la similaridad de las secuencias, se identificó los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-143} y *bla*_{OXA-72}. De las cuales, el gen *bla*_{OXA-143} presentó una alta similaridad con la secuencia de la variante OXA-499 reportada para *A. pittii*. Mientras que, el gen *bla*_{OXA-72} fue idéntico a la secuencia de la variante OXA-72 reportada previamente en el país; del mismo modo, el gen *bla*_{OXA-23} fue similar con secuencias de la variante OXA-23 disponibles en el *Genbank*. Por otro lado, en el gen *bla*_{OXA-51} se identificó al menos cinco haplotipos, tres de aislados clínicos y dos de aislados ambientales, que no han sido reportados anteriormente. Finalmente, todos los genes *bla*_{OXA} se originan de un mismo ancestro en común; en particular, los haplotipos del gen *bla*_{OXA-51} de aislados ambientales se agruparon con secuencias de origen clínico.

En conclusión, la alta resistencia a los carbapenémicos encontrada en *Acinetobacter* spp. está mediada, principalmente, por las oxacilinasas que pueden ser codificadas por genes transferibles. Por otro lado, la posible presencia de *A. baumannii*, bacteria de origen clínico, en ambientes acuáticos constituye una preocupación a nivel de salud. Por estas razones, se resalta la importancia de continuar con la vigilancia de aislados clínicos, así como, de realizar monitoreos de ríos debido a que pueden servir como reservorios de genes de resistencia y de sus patógenos.

Palabras claves: carbapenemasas, filogenia, multirresistencia, oxacilinasas, resistencia adquirida.

ABSTRACT

Acinetobacter spp. are opportunistic pathogens responsible of health care-associated infections. The species of genus *Acinetobacter* have a high resistance to carbapenems; as a consequence, they has become a major public health problem worldwide. The objective of this study was to characterize the resistance to carbapenems in *Acinetobacter* spp. from clinical and environmental isolates from Quito.

For the study, the clinical isolates provided from the National Institute for Public Health and Research were reactivated in sheep blood agar. On the other hand, environmental samples were collected from five rivers, Machángara, Monjas, Pita, San Pedro, and Guayllabamba. The environmental samples were cultivated in selective medium *CHROMO AGAR* to isolate *Acinetobacter* spp. The identification of environmental isolates was performed by automated (VITEK-2) and biochemical tests as catalase, oxidase, and motility. Both clinical and environmental isolates were subjected to antibiotic susceptibility testing based on the disc diffusion method in Muller Hinton agar. In the antibiotic susceptibility test, twelve antibiotics were proved according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute. The monodisk EDTA and boronic acid tests were performed to determine the presence of the metallo- β -lactamase and serin- β -lactamases enzymes, respectively. Moreover, the molecular analysis consisted of DNA extraction by boiling, amplification, and sequencing of nine carbapenems resistance genes, six genes encoding serin- β -lactamases, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}*, and *bla_{OXA-143}*, and three genes encoding metallo- β -lactamases, *bla_{SPM}*, *bla_{SIM}*, and *bla_{GIM}*. Finally, the phylogenetic relationships between *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, and *bla_{OXA-143}* genes were evaluated using Bayesian Inference.

As a result, *Acinetobacter baumannii* and the *A. calcoaceticus/A. baumannii* complex were mainly identified in environmental isolates, of which 50 % of isolates were resistant to imipenem. On the other hand, all clinical isolates of *Acinetobacter* spp. showed a high antibiotic resistance to imipenem and meropenem. In addition, the *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} genes were the most predominant in clinical isolates; whereas, the *bla*_{OXA-51} gene was the most frequent in environmental isolates. According to the statistical analysis, *bla*_{OXA-51} genes did not show significant differences ($p < 0.05$) between clinical and environmental isolates. Based on sequences similarity, the study reports the presence of *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-143}, and *bla*_{OXA-72} genes. The *bla*_{OXA-143} gene was more similar to the sequence of OXA-499 variant reported to *A. pittii*; while, the *bla*_{OXA-72} gene was identical to the sequence of OXA-72 variant previously reported in the country same as the *bla*_{OXA-23} gene was exact to the sequences of OXA-23 variant available in the GenBank. Furthermore, the *bla*_{OXA-51} gene presented at least five different haplotypes, three from clinical isolates and two from environmental isolates, have not been reported before. Finally, all genes *bla*_{OXA} originate from a single common ancestor; in particular, the haplotypes of *bla*_{OXA-51} genes from environmental isolates were grouped with sequences from clinical origin.

In conclusion, the high resistance to carbapenems found in *Acinetobacter* spp. is mainly mediated by transferable genes encoding oxacillinases. Furthermore, the possible presence of *A. baumannii*, bacteria of clinical origin, in aquatic environments is one of the most concern to public health. Therefore, this study highlights the importance of continue surveillance and monitoring rivers due to they may be reservoirs of resistance genes and their pathogens.

Keywords: acquired resistance, carbapenemases, multidrug resistance, phylogeny, oxacillinases

1. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Acinetobacter* son bacilos pleomórficos, aerobios, Gram negativos y no fermentadores de lactosa (Murray, Rosenthal, y Phaller, 2014). *Acinetobacter* spp. se encuentran distribuidos principalmente en el suelo y agua (Raka et al., 2013) aunque también se los considera comensal de la piel humana (Almasaudi, 2016; Doughari, Ndakidemi, Human, y Benade, 2011). En la actualidad, muchas especies de *Acinetobacter* son patógenas oportunistas responsables de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (Gupta, Gandham, Jadhav, y Mishra, 2015; Orozco-Rico, 2011; Rodríguez et al., 2010). Por lo general, las especies patógenas oportunistas del género *Acinetobacter* son multirresistentes y persisten en ambientes inanimados (Brooks, Butel, Carroll, Morse, y Mietzner, 2014; Murray et al., 2014). En particular, *A. baumannii*, una de las especies de importancia clínica, tiene una alta resistencia a los carbapenémicos (Rafei et al., 2014; Rodríguez et al., 2010). En el Ecuador, esta especie es una de las principales responsables de casos de IAAS en la UCI (Jiménez, 2013; Ministerio de Salud Pública [MSP], 2015).

El principal mecanismo de resistencia de *Acinetobacter* spp. a los carbapenémicos es la producción de las enzimas carbapenemasas (Moreno, 2013). Las especies del género han adquirido genes que codifican dos tipos de enzimas, las del tipo serin- β -lactamasas y metalo- β -lactamasas (Abbott, Cerqueira, Bhuiyan, y Peleg, 2013). Sin embargo, las enzimas encontradas con mayor frecuencia son las del tipo oxacilinasas (OXA) que forman parte de la clase D de las serin- β -lactamasas (Routray, Lavanya, Soniya, y Madhavan, 2013). Por otro lado, las enzimas metalo- β -lactamasas han sido detectadas en menor proporción (Miriagou et al., 2010). A nivel de Latinoamérica, hasta el momento, se ha documentado la presencia de las variantes de los genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* y *bla_{OXA-143}*

(Opazo, Domínguez, Bello, Amyes, y González-Rocha, 2012). En el país, cinco estudios mencionan la presencia de carbapenemasas en varias especies de bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (Ayala, 2010; Torres, 2015), *A. baumannii* (Núñez et al., 2016; Torres, 2015) y algunas enterobacterias (Cilveti, Rivera, Rodríguez, y Alcocer, 2013; Gómez, 2011; Torres, 2015). En especial, en *A. baumannii* se ha identificado la variante del gen *bla_{OXA-72}* (Núñez et al., 2016).

A nivel mundial, las especies multirresistentes se han convertido en un serio problema como patógenos asociados a la atención sanitaria (Routray et al., 2013). En los últimos años, la resistencia a antibióticos de última generación como los carbapenémicos ha aumentado, por la adquisición de determinantes genéticos, en varias especies de *Acinetobacter* (Tien et al., 2012). La adquisición de genes de resistencia se da, principalmente, en el medio ambiente en donde se promueve la evolución y el surgimiento de nuevas resistencias en las bacterias (Lupo, Coyne, y Ulrich, 2012; Walsh, Weeks, Livermore, y Toleman, 2011). El principal mecanismo de intercambio genético entre especies es la transferencia horizontal de genes (Krebs, Goldstein, y Kilpatrick, 2014). Uno de los procesos es la conjugación, en la cual, los plásmidos transportan genes de una bacteria a otra (Goering, Dockrell, Zuckerman, Chiodini, y Roitt, 2013; Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, y Silver, 2011). Por ejemplo, los genes *bla_{OXA-23}* (Girlich, Poirel, y Nordmann, 2010; Liu et al., 2015), *bla_{OXA-24/40}* (Grosso, Quinteira, Poirel, Novais, y Peixe, 2012; Mosqueda et al., 2014) y *bla_{OXA-58}* (Fu et al., 2014) son transportados por plásmidos entre diferentes especies de *Acinetobacter*.

Debido a la importancia clínica de *Acinetobacter* spp., el presente estudio pretende responder la siguiente pregunta: ¿Cuáles son los genes de resistencia a los carbapenémicos presentes en aislados clínicos y ambientales de *Acinetobacter* spp. de la ciudad de Quito, Ecuador?

1.1. JUSTIFICACIÓN

Las IAAS causadas por *Acinetobacter* spp. son comunes en la UCI. Por la alta resistencia antimicrobiana que presentan estas especies y por su capacidad de sobrevivir en ambientes inanimados se han convertido en un serio problema de salud pública que afecta tanto en el ámbito económico como social. Por esta razón, varios estudios se enfocan en la detección de los genes responsables de la multirresistencia antibiótica en diferentes especies del género. En el Ecuador, si bien se han realizado estudios para determinar la presencia de las enzimas carbapenemasas en varias especies bacterianas, la información sobre la caracterización de los genes de resistencia a los carbapenémicos aún es escasa para aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. Por otro lado, no existe información sobre el tema para aislados ambientales hasta el momento. Por la importancia clínica que tienen las diferentes especies de *Acinetobacter*; en particular, *A. baumannii* se ve en la necesidad de realizar el presente estudio en donde se incluye tanto aislados clínicos como ambientales.

Los resultados del estudio darán a conocer el perfil de resistencia a los carbapenémicos en varias especies de *Acinetobacter* tanto de aislados clínicos como ambientales. En particular, el estudio determinará la presencia de diferentes genes *bla_{OXA}*, serin- β -lactamasas, así como de algunos genes que codifican a las metalo- β -lactamasas. Estos resultados son importantes debido a que ayudarán a determinar si las variantes de los diferentes genes presentes en el país son registros nuevos o no. Además, los resultados indicarán que gen de resistencia es el más frecuente en aislados clínicos y ambientales. A nivel de salud, esta información es relevante porque al determinar las enzimas presentes en la o las especies de *Acinetobacter* se podrán establecer estrategias de vigilancia eficientes para controlar las diferentes infecciones causadas por este agente patógeno. De este modo se suministrará antibióticos de manera adecuada, brindando un tratamiento rápido y efectivo

para los pacientes, reduciendo gastos innecesarios y tiempo de hospitalización. Por lo tanto, los resultados del estudio traerán beneficios económicos tanto para los pacientes como para el hospital. Toda esta información es esencial conocerla debido a que ayudará a establecer medidas adecuadas de control para evitar la propagación de nuevas cepas con genes de resistencia a antibióticos de última generación.

Por otro lado, los resultados del presente estudio también ayudarán a entender la relación entre los genes de resistencia presentes en aislados clínicos y ambientales. Si los genes que se encuentran en ambientes hospitalarios son los mismos o no, o si tienen alguna relación con los genes que se encuentran en el medio ambiente. Esta información es fundamental para poder inferir sobre el origen de la resistencia a los carbapenémicos. Además, la información es indispensable para entender el proceso evolutivo y los mecanismos genéticos implicados con la resistencia adquirida de los diferentes genes de resistencia reportados para las especies de *Acinetobacter*.

El estudio planteado fue viable porque fue autofinanciado en su totalidad. Además, la presente investigación contó con la infraestructura tanto del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública [INSPI]-Quito, así como de la Escuela de Bioanálisis y de Ciencias Biológicas de la PUCE para realizar los análisis microbiológicos y moleculares.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la resistencia a los carbapenémicos de *Acinetobacter* spp. a partir de aislados clínicos y ambientales de la ciudad de Quito, Ecuador, para el conocimiento de los principales genes que están circulando en diferentes ambientes.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar *Acinetobacter* spp. de cinco ríos, Monjas, Machángara, Pita, San Pedro y Guayllabamba, mediante pruebas microbiológicas.
2. Determinar la resistencia antibiótica de *Acinetobacter* spp. de aislados clínicos y ambientales a través de la prueba de difusión de disco.
3. Detectar la presencia de las enzimas metalo- β -lactamasas y serin- β -lactamasas por medio de la prueba de sinergia de doble disco.
4. Identificar molecularmente los genes responsables de la resistencia a los carbapenémicos de *Acinetobacter* spp. de aislados clínicos y ambientales en base a la reacción en cadena de la polimerasa y el secuenciamiento.
5. Analizar las relaciones de cuatro genes de resistencia que codifican las oxacilinasas de aislados clínicos y ambientales mediante inferencia bayesiana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Varias especies de *Acinetobacter* multirresistentes están asociadas a las IAAS (Gupta et al., 2015; Orozco-Rico, 2011; Rodríguez et al., 2010). Diversos estudios reportan la presencia de carbapenemasas codificadas por diferentes genes en *Acinetobacter* spp. En la actualidad, las enzimas del tipo metalo- β -lactamasas codificadas por los genes *bla_{IMP}* (Amudhan, Sekar, Kamalanathan, y Balaraman, 2012; Chen et al., 2011), *bla_{VIM}* (Amudhan et al., 2012), *bla_{SIM}* (Zhou et al., 2011), *bla_{SPM}* (Shahcheraghi, Abbasalipour, Feizabadi, Ebrahimipour, y Akbari, 2011) y *bla_{NDM}* (Liu et al., 2014; Wang et al., 2012; Wei et al., 2015) han sido documentadas para varias especies del género.

No obstante, las enzimas oxalacilinasas, serin- β -lactamasas, codificadas por los genes *bla_{OXA-23}* (Chen et al., 2011; Quiñonez et al., 2015; Shahcheraghi et al., 2011), *bla_{OXA-24}* (Mesli, Berrazeg, Drissi, Bekkhoucha, y Rolain, 2013; Todorova, Velinov, Ivanov, Dobрева, y Kantardjiev, 2014), *bla_{OXA-51}* (Chen, Lee et al., 2010; Shahcheraghi et al., 2011), *bla_{OXA-58}* (Boo y Crowley, 2009; Chen, Chang et al., 2010) y *bla_{OXA-143}* (Higgins, Poirel, Lehmann, Nordmann, y Seifert, 2009; Mostachio et al., 2012; Zander et al., 2014) son las más encontradas en diferentes especies de *Acinetobacter*. Por ejemplo, las variantes *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-23}* han sido identificadas en aislados clínicos de *A. baumannii*, *A. radioresistens* y *A. lwoffii* (Figueiredo, Bonnin, Poirel, Duranteau, y Nordmann, 2011). Por otro lado, las variantes del gen *bla_{OXA-143}* han sido caracterizadas en las especies *A. baumannii* y *A. pittii* (Zander et al., 2014); mientras que, las variantes *bla_{OXA-58}* han sido identificadas en *A. baumannii* (Ji et al., 2014) y *A. nosocomialis* (Chen, Chang et al., 2010).

Hasta el momento, se ha documentado la presencia de las variantes OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58 y OXA-143 a nivel de Latinoamérica (Opazo, Domínguez et al., 2012). De las cuales, las enzimas OXA-23, OXA-51 y OXA-58 son las más predominantes en aislados clínicos (Labarca, Costa, Seas, y Guzmán-Blanco, 2016); mientras que, en aislados de aguas residuales, se ha reportado la presencia de OXA-23 en Brasil (Ferreira et al., 2011). En el Ecuador, los pocos reportes mencionan que los genes *bla_{GES}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* y *bla_{OXA}*, relacionados con la resistencia a carbapenémicos, estarían circulando en el ambiente hospitalario (Ayala, 2010; Cilveti et al., 2013; Núñez et al., 2016; Torres, 2015). En el país, estos genes han sido reportados en varios aislados clínicos de las especies *Pseudomonas aeruginosa* (Ayala, 2010), *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* (Cilveti et al., 2013; Torres, 2015), *Serratia marcescens*, *E. aerogenes* (Cilveti et al., 2013) y *Acinetobacter baumannii* (Núñez et al., 2016). En particular, en la especie *A. baumannii* se ha encontrado el gen *bla_{OXA-72}* procedente de aislados clínicos de la ciudad de Guayaquil (Núñez et al., 2016) y el gen *bla_{KPC}* de aislados clínicos de la ciudad de Quito (Torres, 2015). A nivel de medio ambiente, hasta el momento, no se ha reportado estudios relacionados con la presencia de carbapenemasas en *Acinetobacter* spp.; en particular, en ambientes acuáticos como ríos.

2.2. INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD

Las IAAS, infecciones asociadas al cuidado de la salud, reemplazan a otras denominaciones conocidas anteriormente como infecciones intrahospitalarias o nosocomiales (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015; Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2010). Las IAAS son aquellas que se presentan o se desarrollan en un paciente, por lo general, al momento de ser ingresado en un hospital o centro hospitalario (OPS, 2010). Estas infecciones traen complicaciones a nivel localizado o sistémico en el

organismo debido principalmente a la presencia de uno o varios microorganismos patógenos o sus toxinas, las mismas que se manifiestan durante un tratamiento clínico, estadía hospitalaria de 48 a 72 horas o incluso después del egreso del paciente del hospital (OMS, 2015; OPS, 2010). Sin embargo, no solo los pacientes son el principal grupo de riesgo para adquirir este tipo de infecciones, sino también, el personal sanitario (OMS, 2015).

A nivel mundial, las IAAS constituyen un gran problema de salud pública (OPS, 2012) debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad (Guitian et al., 2012; OMS, 2015; OPS, 2012; Pujol y Limón, 2013). En particular, las IAAS causadas por microorganismos multirresistentes con la capacidad de adquirir nuevas resistencias, aumentan la preocupación (Guitian et al., 2012; OMS, 2015). Por otro lado, las IAAS también tienen un alto impacto a nivel económico, principalmente, en Latinoamérica (OPS, 2012). Los costos en el tratamiento de este tipo de infecciones aumentan debido a diferentes factores como la prolongada estancia hospitalaria, muertes innecesarias y aumento de los costos hospitalarios (Guitian et al., 2012; OMS, 2015; Pujol y Limón, 2013).

A nivel mundial, la tasa de incidencia de las IAAS varía del 5 al 10 % (OMS, 2016). Aunque no se cuenta con datos de la tasa de incidencia a nivel de Latinoamérica, se reportan datos puntuales ya sea de centros de salud o solo de algunos países (OPS, 2012). Por ejemplo, en Perú se ha documentado una incidencia mayor a la mundial, la misma que varía de un 0 al 15 %, dependiendo de la categoría del establecimiento y su complejidad (Ministerio de Salud-Dirección General de Epidemiología de Perú, 2014). A pesar de que, el reporte de las IAAS es obligatorio; en el Ecuador, no se cuenta con datos de incidencia o prevalencia de este tipo de infecciones intrahospitalarias (MSP, 2009). Sin embargo, en el país se han reportado pocos estudios independientes en donde dan a conocer sobre las infecciones asociadas con la atención a la salud. Por ejemplo, en el 2011, un estudio realizado en el

Hospital Alcívar de Guayaquil determinó que la mayor tasa de infecciones adquiridas ocurre en la UCI con una frecuencia de 2,8 % (Alemán, Cevallos, Izquierdo, Peña, y Vanegas, 2011).

En especial, los procedimientos invasivos tienen un papel fundamental para el desarrollo de las IAAS (Sydnor y Perl, 2011). Estos procedimientos permiten la entrada tanto de flora normal del paciente como de aquella que está presente en las superficies inanimadas o propias del personal de salud (Pujol y Limón. 2013). En el país de acuerdo a dos estudios, la frecuencia y el tipo de microorganismo difiere entre hospitales. Por ejemplo, los microorganismos más frecuentes encontrados en el Hospital Alcívar de Guayaquil fueron principalmente especies Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae* con un alto porcentaje (50 %), seguido de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (33 %) y *Acinetobacter baumannii* (17 %) (Alemán et al., 2011). Mientras que, para el estudio realizado en el Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito, el microorganismo más frecuente de la UCI fue *A. baumannii* (21 %) en conjunto con *Staphylococcus* coagulasa negativos multirresistentes, seguido de *Escherichia coli* (14 %). En menor porcentaje, se menciona a *S. aureus* meticilino resistente (9 %), *K. pneumoniae* (8 %), *Pseudomonas aeruginosa* (7 %) y *Enterococcus* spp. (4 %) (Jiménez, 2013).

Entre las principales infecciones intrahospitalarias se reportan a las urinarias, quirúrgicas, respiratorias y bacteriemias (Pujol y Limón, 2013). Estas infecciones se desarrollan con mayor frecuencia en la UCI en donde los porcentajes varían dependiendo del tipo de infección. Sin embargo, las infecciones urinarias son las más prevalentes con un 40 % seguidas de heridas quirúrgicas que representan el 25 %, las infecciones respiratorias varían del 15 al 20 % y otras infecciones como las bacteriemias constituyen solo el 10 % de las infecciones adquiridas en el hospital (Pérez, Zurita, Pérez, Patiño, y Calvimonte, 2010).

La aparición de cualquier tipo de infección puede ser mediada por factores de riesgos endógenos o exógenos (Pérez et al., 2010; Pujol y Limón, 2013). Los factores de riesgo endógenos están relacionados con la condición de los pacientes como la edad, la condición nutricional, el tratamiento prolongado con antibióticos, estrés y el estado inmunológico. Mientras que, los factores exógenos constituyen los procedimientos asistenciales invasivos (Pujol y Limón, 2013) como el uso incorrecto de dispositivos y condiciones ambientales inadecuadas (Pérez et al., 2010; Pujol y Limón, 2013; Sydnor y Perl, 2011).

2.3. *Acinetobacter* spp.

2.3.1. Generalidades

Acinetobacter spp. son bacterias Gram negativas aerobias estrictas (Murray et al., 2014). La bacteria se caracteriza por su morfología microscópica como cocobacilos cortos y anchos de 0,9 a 1,6 µm de diámetro y de 1,5 a 2,5 µm de longitud (Raka et al., 2013). A nivel macroscópico, las colonias de *Acinetobacter* spp. son lisas de bordes regulares, mucoides de color amarillo pálido o gris (Visca, Seifert, y Towner, 2011). Las especies se caracterizan por ser oxidasa negativa, catalasa positiva e indol negativo; por otro lado, las especies no fermentan azúcares y no son móviles (Murray et al., 2014; Raka et al., 2013). *Acinetobacter* spp. son bacterias mesófilas que crecen a 37°C, aunque se menciona que las ambientales crecen a bajas temperaturas (Visca et al., 2011).

Acinetobacter spp. descritas como *Micrococcus calcoaceticus* por Beijerinck en 1911 pertenecen a la familia Moraxellaceae del orden Pseudomonadales (Raka et al., 2013). Hasta el momento, el género *Acinetobacter* está constituido por cuarenta y nueve especies genómicas (Nemec et al., 2016). Sin embargo, por la complejidad taxonómica que presentan las especies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* y *A. genomic species 13TU* se las ha

agrupado dentro del complejo *A. calcoaceticus/A. baumannii* (Nemec et al., 2011). Estas especies se caracterizan por ser los patógenos oportunistas más representativos del género, asociadas principalmente con problemas de salud en los hospitales (Lee et al., 2011; Raka et al., 2013).

Las especies del género tienen una distribución cosmopolita en la naturaleza (Almasaudi, 2016; Kostka et al., 2011; Raka et al., 2013). *Acinetobacter* spp. pueden estar presente en el suelo, vertientes naturales (Raka et al., 2013), océanos, sedimentos (Kostka et al., 2011), sitios contaminados con hidrocarburos (Mahjoubi et al., 2013), aguas residuales y en diferentes partes del cuerpo humano como la piel (Almasaudi, 2016; Doughari, et al., 2011). La especie *A. calcoaceticus* se la puede encontrar principalmente en el agua y suelo (Doughari et al., 2011; Nemec et al., 2011) aunque también se la ha reportado en la piel sin causar infecciones graves en humanos (Lee et al., 2011; Nemec et al., 2011). La especie *A. lwoffii* a pesar de encontrarse asociada a humanos (Lee et al., 2011) también se la ha aislado de alimentos de origen animal (Wang et al., 2012). Por otro lado, las especies clínicas como *A. baumannii*, *A. haemolyticus* y *A. nosocomialis* se las puede aislar de diferentes matrices como la piel, mucosas y secreciones (Manchanda, Sanchaita, y Singh, 2010).

Debido a la capacidad de adaptación de las especies se las encuentran también en superficies húmedas y secas de ambientes intrahospitalarios (Almasaudi, 2016). En superficies húmedas, las especies están presentes en las mucosas, humidificadores ambientales o vaporizadores y equipos de terapia respiratoria (Brooks et al., 2014; Murray et al., 2014). Mientras que, en superficies secas, estos microorganismos pueden estar en la piel, dispositivos clínicos y en el medio ambiente hospitalario, en donde pueden sobrevivir por largos periodos bajo condiciones adversas (Brooks et al., 2014; Doughari et al., 2011; Murray et al., 2014; Sydnor y Perl, 2011). Entre las especies que se encuentran en ambientes

hospitalarios se mencionan a *A. baumannii* (Evans et al., 2013), *A. nosocomialis*, *A. pittii* (Evans et al., 2013; Karah et al., 2011) y *A. haemolyticus* (Jung y Park, 2015). En particular, *A. baumannii* puede sobrevivir por más de cuatro meses en superficies secas incluso puede soportar condiciones desfavorables por más tiempo que *Escherichia coli* (Raka et al., 2013); razón por la cual, la especie es uno de los patógenos oportunistas más aislados de IAAS en la UCI (Almasaudi, 2016; OMS, 2010).

2.3.2. Epidemiología

Aunque *Acinetobacter* spp. tienen una virulencia baja, varias especies del género constituyen patógenos oportunistas de gran preocupación a nivel mundial (Almasaudi, 2016). Las especies se caracterizan por su alta resistencia a una amplia gama de antibióticos; por lo que, el tratamiento contra estas especies se vuelve ineficiente (Mesli et al., 2013; Naas y Nordmann, 2010), aumentando el riesgo de muerte de los pacientes. Las especies de *Acinetobacter* se caracterizan por presentar una resistencia tanto intrínseca como adquirida (Doughari et al., 2011; Hammoudi et al., 2015). Diversas especies del género son naturalmente resistentes a los betalactámicos (β -lactámicos), fluoroquinolonas, aminoglucósidos y a ciertos carbapenémicos. Por lo que, muy pocos antibióticos como el colistín, tigeciclina y rinfampicina constituyen una alternativa para el tratamiento de las infecciones causadas por estas especies (Guitian et al., 2012; Naas y Nordmann, 2010). Por otro lado, las especies de *Acinetobacter* continuamente adquieren multirresistencia a los antibióticos; en especial, a los carbapenémicos como el meropenem, imipenem (Almasaudi, 2016) y doripenem (Guitian et al., 2012).

Una de las especies que se caracterizan por una alta resistencia a los carbapenémicos es *Acinetobacter baumannii* debido a la producción de enzimas que los hidrolizan (Guitian

et al., 2012; Papp-Wallace, Endimiani, Taracila, y Bonomo, 2011; Zuñiga et al., 2010). En la especie, la resistencia a los carbapenémicos, imipenem y meropenem, se reportó en un 55,3 % de acuerdo a la vigilancia realizada en treinta y seis países a nivel mundial (Rosenthal et al., 2012). En particular, en Latinoamérica, *Acinetobacter* spp. presentaron niveles de susceptibilidad a los carbapenémicos que varía del 8 al 63 %. En el Ecuador, para *A. baumannii* se registró una resistencia al meropenem e imipenem en un 54 % y 51 %, respectivamente, hasta el 2010 (Labarca et al., 2016). De acuerdo a la Red *Whonet* de Ecuador, estos valores se han incrementado a un 62 % tanto para el imipenem como meropenem para la mencionada especie en el 2014 (WHONET, 2015). En particular, la resistencia a los carbapenémicos es mediada por β -lactamasas del tipo OXA (Zuñiga et al., 2010) como la OXA-23 y OXA-58 que tiene una diseminación mundial (Guitian et al., 2012; Labarca et al., 2016).

La presencia de *Acinetobacter* spp. ya sea en ambientes inanimados o como microflora normal bucofaríngea constituyen factores para generar niveles más graves de infección durante la hospitalización tanto en pacientes enfermos como en sanos (Brooks et al., 2014; Murray et al., 2014); sin embargo, esto dependerá principalmente de los factores endógenos mencionados anteriormente. *Acinetobacter* spp. son responsables de altas tasas de mortalidad en las UCIs (54 %) aunque se ha reportado su presencia en tasas bajas en salas generales (5 %) (Kempf y Rolain, 2012). Las especies han sido relacionadas con un amplio rango de IAAS que varía del 1 al 3 %; en particular, la especie *A. baumannii* ha sido asociada en un alto porcentaje, principalmente, con IAAS en pacientes críticamente enfermos hospitalizados (Naas y Nordmann, 2010; Visca et al., 2011). En baja proporción, se menciona a *A. nosocomialis* y *A. pittii* (Visca et al., 2011; Karah et al., 2011) aunque también

se ha reportado otras especies como *A. lwoffii*, *A. haemolyticus* (Raka et al., 2013), *A. junii* (Mesli et al., 2013), *A. johnsonii* y *A. calcoaceticus* (Naas y Nordmann, 2010).

Acinetobacter baumannii es la principal responsable de IAAS (Doughari et al., 2011; Naas y Nordmann, 2010; Visca et al., 2011; Zúñiga et al., 2010), representando aproximadamente el 80 % a nivel mundial (OMS, 2010). La especie es causante de infecciones intrahospitalarias en un 2 % al 10 % en Europa y los Estados Unidos de América (OMS, 2010). En Latinoamérica, pocos son los países que reportan la prevalencia de *Acinetobacter* spp.; sin embargo, de acuerdo a un estudio el punto de prevalencia fue de 14 % en 719 pacientes (Labarca et al., 2016). Por otro lado, los porcentajes varían dependiendo del tipo de infección; como, por ejemplo, *Acinetobacter* spp. han sido reportados en un 7,2 % para infecciones en la sangre, 17,7 % en neumonía y 9,9 % en infecciones de heridas quirúrgicas (Gales, Castanheira, Jones, y Sader, 2012). En el Ecuador, no hay reportes a nivel de MSP; sin embargo, de acuerdo a estudios individuales se ha reportado la presencia de *A. baumannii* en un 17 % y 21 % (Alemán et al., 2011 y Jiménez, 2013), porcentajes que varían de acuerdo al hospital.

2.4. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias de bajo peso molecular sintetizados por diferentes microorganismos que destruyen o inhiben el crecimiento de otros microorganismos patógenos a bajas concentraciones (Illuminati, 2015). Originalmente, los antibióticos eran agentes naturales como la penicilina; sin embargo, en la actualidad, muchos antibióticos son semisintéticos o sintéticos (Murray et al., 2014) debido a que son modificados estructuralmente con componentes químicos artificiales (Murray et al., 2014; Illuminati, 2015). Los antibióticos de acuerdo al sitio de acción en las bacterias se los clasifica en cuatro

familias: i) inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, ii) inhibidores de la síntesis de proteínas, iii) inhibidores de ácidos nucleicos y iv) los que actúan a nivel de membrana y síntesis de folato (Martínez, 2013; Murray et al., 2014).

2.4.1. Betalactámicos

Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas cuya función es evitar la síntesis de peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Rice, 2012) e inducir lisis (Gómez, García-Vázquez, y Hernández-Torres, 2015; Papp-Wallace et al., 2011). El principal mecanismo de acción es la alteración de la reacción de transpeptidación catalizada por proteínas ligadoras de penicilinas (PBP, por sus siglas en inglés) (Palzkill, 2013; Rubtsova, Ulyashova, Bachmann, Schmid, y Egorov, 2010). Los β -lactámicos son estructuralmente similares a D-alanil-D-alanina, aminoácido terminal necesario para la síntesis de la pared peptídica (McDermott y White, 2011). Este tipo de antibiótico se une irreversiblemente al sitio activo de las PBP (Palzkill, 2013; Papp-Wallace et al., 2011), generando un efecto autolítico (Papp-Wallace et al., 2011). Por otro lado, los β -lactámicos también pueden activar la autolisina bacteriana, sustancia endógena que induce a la lisis del peptidoglicano en concentraciones superiores a 4 y 10 veces de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de un microorganismo en particular (Gómez et al., 2015). Entre los antibióticos que pertenecen a esta familia están las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactames (Jeon et al., 2015; McDermott y White, 2011; Palzkill, 2013; Rubtsova et al., 2010).

2.4.1.1. Carbapenémicos

Los carbapenémicos son antibióticos que actúan contra bacterias Gram negativas y positivas (Palzkill, 2013; Papp-Wallace et al., 2011). Los carbapenémicos tienen un anillo β -lactámico fusionado con un anillo parecido al grupo de las penicilinas (Palzkill, 2013). El

mecanismo de acción de estos antibióticos es impedir la síntesis de la pared bacteriana e inhibir el ensamblaje del peptidoglicano (Moreno, 2013; Papp-Wallace et al., 2011). Este tipo de antibióticos constituyen la última elección para el tratamiento de infecciones; especialmente, las causadas por bacterias aerobias Gram negativas (Rice, 2012). Entre los carbapenémicos más usados se menciona al imipenem y meropenem (Guitian et al., 2012; Orozco-Rico, 2011). Sin embargo, las bacterias han adquirido resistencia a este tipo de antibióticos, uno de los mecanismos es la producción de enzimas de hidrólisis enzimática como las β -lactamasas (Palzkill, 2013). Estas enzimas incrementan su expresión con otros mecanismos de resistencia como la alteración de las porinas, modificación del sitio blanco y las bombas de eflujo (Moreno, 2013).

En general, las β -lactamasas de acuerdo a Bush y Jacoby (2010) se clasifican en tres grupos tomando en consideración la actividad enzimática y de sus inhibidores. Los grupos son: i) cefalosporinasas, ii) β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas resistentes a los inhibidores y serin- β -carbapenemasas y iii) metalo- β -lactamasas. Por otro lado, de acuerdo a Ambler, las β -lactamasas se clasifican en cuatro clases A, B, C y D de acuerdo a sus sitios activos y secuencias aminoacídicas (Navarro et al., 2011). Las β -lactamasas que dan resistencia a los carbapenémicos son las carbapenemasas (Orozco-Rico, 2011).

2.5. CARBAPENEMASAS

Las carbapenemasas son enzimas β -lactamasas que hidrolizan a los carbapenémicos, (Malhotra, Walia, Aslam, y Goyal, 2012; Moreno, 2013; Papp-Wallace et al., 2011) y otros β -lactámicos (Moreno, 2013), confiriendo así la resistencia bacteriana. Muchas bacterias Gram negativas sintetizan carbapenemasas codificadas por genes que pueden estar presentes

tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos extracromosomales (Moreno, 2013). Entre las especies productoras de carbapenemasas se encuentran las enterobacterias (Diane y Rolain, 2014; Nordmann, Nass, y Poirel, 2011) y otras especies (Diane y Rolain, 2014). Entre las enterobacterias, la especie de donde se ha aislado con mayor frecuencia este tipo de enzimas es *Klebsiella pneumoniae* (Nordmann et al., 2011). Por otro lado, las especies de *Acinetobacter* también son productoras de carbapenemasas (Diane y Rolain, 2014). Según la clasificación de Ambler, las carbapenemasas se clasifican en dos grupos, serin- β -lactamasas y metalo- β -lactamasas (Diane y Rolain, 2014; Jeon et al., 2015; Moreno, 2013; Orozco-Rico, 2011; Walsh, 2010).

2.5.1. Serin- β -lactamasas

Las serin- β -lactamasas son enzimas que contienen un residuo de serina en su sitio activo, útil para la inactivación del β -lactámico (Diane y Rolain, 2014). Estas enzimas hidrolizan principalmente a las penicilinas y las cefalosporinas de manera más eficiente que a los carbapenémicos (Jeon et al., 2015; Moreno, 2013). El mecanismo de acción de este tipo de enzimas consiste en la unión irreversible de la serina al centro catalítico del anillo β -lactámico mediante un enlace covalente, volviéndolo inactivo (Diane y Rolain, 2014). Sin embargo, la mayoría de las enzimas de este tipo son inhibidas por el ácido clavulánico y Ácido Etilenodiamino Tetracético (EDTA, por sus siglas en inglés) (Jeon et al., 2015). De acuerdo a Ambler, estas enzimas se clasifican en la clase A, C y D (Jeon et al., 2015; Papp-Wallace et al., 2011); mientras que, de acuerdo a Bush y Jacoby (2010), las serin- β -lactamasas forman parte del grupo 2.

2.5.1.1. Clase A

Las enzimas de Clase A de las serin- β -lactamasas son de origen plasmídico (Navarro et al., 2011) o cromosómico (Malhotra et al., 2012). Estas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico (Malhotra et al., 2012; Navarro et al., 2011) y el tazobactam (Moreno, 2013) pero no por el EDTA (Navarro et al., 2011). Dentro de esta clasificación se encuentran seis subgrupos que incluyen: i) β -lactamasas de amplio espectro (BLEA, por sus siglas en inglés), ii) β -lactamasas de espectro extendido (BLEE, por sus siglas en inglés), iii) β -lactamasas de espectro extendido tipo TEMP, iv) β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV, v) β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M (Rubtsova et al., 2010; Thirapanmethee, 2012) y vi) el grupo conformado por las enzimas SME, NMC, KPC, GES (Diane y Rolain, 2014; Moreno, 2013), IMI y SFC (Moreno, 2013). Enzimas que han sido descritas en varias especies bacterianas (Moreno, 2013; Navarro et al., 2011).

De todas las enzimas, la enzima GES tiene una amplia diseminación mediada principalmente por plásmidos transferibles (Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2011) o por *cassettes* genéticos dentro de integrones clase 1 (Bonnin et al., 2011; Moreno, 2013). Hasta el momento, se ha reportado la presencia de al menos dieciséis variantes, las mismas que difieren en su estructura de uno a tres residuos de aminoácidos (Bogaerts et al., 2010). Esta enzima ha sido documentada en varias especies como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Poirel, Bonnin, y Nordmann, 2011) y *Acinetobacter baumannii* (Bogaerts et al., 2010). En Sudamérica, las variantes GES-5 y 7 han sido descritas en especies del género *Klebsiella* en Brasil (Dropa et al., 2010; Ribeiro, Falci Rozales, Barth, y Zavascki, 2014); mientras que, las variantes GES-1 (Shahcheraghi et al., 2011), GES-11 (Cicek et al., 2013; Charfi-Kessiss et al., 2014; Chihi et al., 2016; Moubareck, Brémont,

Conroy, Courvalin, y Lambert, 2009) y GES-14 (Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2011) han sido reportadas en *A. baumannii* en diferentes partes del mundo.

2.5.1.2. Clase D

Las enzimas de clase D o también conocidas como oxacilinasas (OXAs) son de origen plasmídico y cromosómico (Evans y Amyes; 2014). Por lo tanto, estas enzimas pueden estar presentes de forma natural y adquiridas, principalmente, en diferentes especies de *Acinetobacter* (Poirel et al., 2010; Walsh, 2010). Estas enzimas hidrolizan la oxacilina y cloxacilina, pero no cefalosporinas de espectro extendido ni al aztreonam (Bush y Jacoby, 2010; Moreno, 2013). El gen *bla_{OXA}* fue encontrado por primera vez en *A. baumannii* como un mecanismo de resistencia contra el imipenem (Evans, Hamouda, y Amyes, 2013; Verma et al., 2011). Por lo general, las enzimas son inhibidas por el EDTA, pero no por el ácido clavulánico (Bush y Jacoby, 2010; Palzkill, 2013).

En la actualidad, se ha reportado alrededor de 150 variantes del gen *bla_{OXA}*, las mismas que se caracterizan por sus variaciones genéticas, además de su heterogeneidad en el espectro de hidrólisis a los β -lactámicos (Poirel et al., 2011). Las variantes han sido agrupadas en distintos grupos en base a la homología de su secuencia (Manchanda et al., 2010); de las cuales, al menos cinco grupos, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-51-like (Boo y Crowley, 2009; Evans y Amyes, 2014) y OXA-143-like (Evans y Amyes, 2014), han sido descritos en varias especies de *Acinetobacter* (Périchon et al., 2014). En el grupo denominado OXA-23-like se ha agrupado tres variantes, OXA-23, OXA-27 y OXA-49. En el segundo grupo, OXA-24/40-like se incluyen seis diferentes variantes, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72 y OXA-160 (Evans y Amyes, 2014); mientras que, el grupo conformado por OXA-58-like está conformado por tres variantes OXA-58,

OXA-96 y OXA-97 (Evans y Amyes, 2014; Jeon et al., 2015) y el nuevo grupo OXA-143-like contiene cuatro variantes, OXA-182 (Kim et al., 2010), OXA-231, OXA-253 (Gionco et al., 2012; Girlich, Damaceno, Oliveira, y Nordmann, 2014) y OXA-255 (Zander et al., 2014). Finalmente, la enzima OXA-51 se caracteriza por tener al menos 95 variantes (Jeon et al., 2015). La enzima OXA-51 es codificada por el gen intrínseco *bla*_{OXA51} que se encuentra de forma natural en *A. baumannii* (Higgins et al., 2010; Périchon et al., 2014) aunque también se lo ha reportado en otras especies del género (Perichón et al., 2014). Por lo general, la enzima confiere débilmente resistencia a los carbapenémicos (Gordon y Wareham, 2010) pero cuando se inserta el elemento de inserción *ISAbal* la resistencia a los carbapenémicos aumenta en la bacteria (Jung y Park, 2015; Sen y Joshi, 2015).

Las enzimas OXA se las ha descrito dentro de integrones que se los puede encontrar en plásmidos o transposones e incluso en elementos de inserción (Moreno, 2013). *Acinetobacter* spp. han adquirido genes de resistencia que codifican las diferentes variantes de las enzimas OXA mediante transferencia horizontal de genes mediada principalmente por plásmidos (Evans y Amyes, 2014; Fu et al., 2014). Entre las enzimas de importancia adquiridas por las especies de *Acinetobacter* se menciona a OXA-23, OXA-24 (Khorsi, Messai, Hamidi, Ammari, y Bakour, 2015), OXA-58 y OXA-143 (Evans y Amyes, 2014; Navarro et al., 2011; Papp-Wallace et al., 2011). En la especie *A. baumannii*, la primera enzima del tipo OXA en ser descrita fue la OXA-23 en Escocia, Reino Unido (Liu et al., 2015). El gen *bla*_{OXA-23} se encuentra en un transposón, entre los más reportados están Tn2006, Tn2007, Tn2008 (Evans y Amyes, 2014; Mugnier, Poirel, Naas, y Nordmann, 2010; Wang et al., 2015) y Tn2009 (Liu et al., 2015). La enzima OXA-40 fue reportada también en *A. baumannii* después de la aparición de la enzima OXA-23 en España. En la actualidad, el gen codificante de las enzimas OXA se las ha identificado en plásmidos de

otras especies como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Evans y Amyes, 2014).

Actualmente, varios estudios han demostrado que genes que codifican las enzimas OXA aparecen naturalmente y están ubicadas en el cromosoma de varias especies de *Acinetobacter* (Figueiredo, Bonnin et al., 2011; Périchon et al., 2014, Poirel et al., 2010). Algunas enzimas OXA son específicas para diferentes especies de *Acinetobacter*; por lo que, constituyen un marcador molecular para poder identificarlas (Figueiredo, Bonnin et al., 2011; Kamolovit, Higgins, Paterson, y Seifert, 2014; Périchon et al., 2014; Turton, Hyde, Martin, y Shah, 2012). Como se mencionó anteriormente, la enzima OXA-51 es intrínseca y actúa como marcador de la especie *A. baumannii* (Périchon et al., 2014); mientras que, las variantes OXA-134 constituye marcador para la identificación de especies como *A. lwoffii* (Figueiredo, Bonnin et al., 2011; Jeon et al., 2015; Périchon et al., 2014) y *A. schindleri* (Turton et al., 2012). Otras enzimas como OXA-228, OXA-211, OXA-213 y OXA-214; OXA-235 sirven de marcadores moleculares para la detección de *A. bereziniae*, *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* y *A. haemolyticus*, respectivamente (Figueiredo, Bonnin et al., 2011; Jeon et al., 2015; Kamolovit et al., 2014; Périchon et al., 2014).

2.5.2. Metallo- β -lactamasas

Las metallo- β -lactamasas o clase B son enzimas que se caracterizan por poseer uno o dos cationes divalentes del tipo Zinc (Bush y Jacoby, 2010; Papp-Wallace et al., 2011; Rice, 2012) que funciona como cofactor para la actividad enzimática (Rice, 2012). El mecanismo de acción de estas enzimas radica en la unión del Zinc al sitio activo del antibiótico, paso esencial para su mecanismo de acción hidrolítica sobre los carbapenémicos (Palzkill, 2013; Papp-Wallace et al., 2011). Estas enzimas son inhibidas por el EDTA, pero no por el ácido

clavulánico (Palzkill, 2013; Vanegas-Múnera, Roncancio-Villamil, y Jiménez-Quiceno, 2014), sulbactam o tazobactam (Palzkill, 2013). Actualmente, las metalo- β -lactamasas se clasifican en seis diferentes tipos como son IMP, VIM, SPM, GIM, SIM y NDM (Diane y Rolain, 2014). Las enzimas metalo- β -lactamasas han sido descritas en varias especies como *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Palzkill, 2013). Los genes que codifican este tipo de enzimas pueden estar dentro del cromosomas (Moreno, 2013), integrones de clase 1 (Gordon y Wareham, 2010), plásmidos o transposones (Moreno, 2013).

Actualmente, la enzima NDM es endémica de Nueva Delhi; sin embargo, la enzima presenta una rápida diseminación incluso ya se encuentra en varias especies de *Acinetobacter* de diferentes partes del mundo (Quiñones et al., 2015; Luo et al., 2014; Sun, Liu et al., 2014; Wang et al., 2012). Mientras que, las enzimas más predominantes de las metalo- β -lactamasas, VIM e IMP, han sido descritas principalmente en enterobacterias (Demir, Zer, y Karaoglan, 2015) y en otras especies como *Pseudomonas aeruginosa* (Ghangosha et al., 2015) y *A. baumannii* (Koh, Sng, Yeng, Hsu, y Zhao, 2007; Poirel et al., 2011). Por otro lado, la enzima SIM codificada por el gen *bla_{SIM}* fue caracterizada en China (Zhou et al., 2011) y Corea (Kim et al., 2013; Lee et al., 2010). Este gen es transferido a través de plásmidos transferibles (Kim et al., 2013) dentro de integrones clase 1 (Sun et al., 2016) aunque también se ha mencionado su presencia a nivel cromosómico en *Acinetobacter* spp. (Lee et al., 2010). El gen tiene dos variantes que difieren por un residuo de aminoácido en su estructura (Sun et al., 2016). La variante SIM-1 se encuentra en *A. baylyi* (Zhou et al., 2011), *A. genomoespecie* 10 (Lee et al., 2010), *A. pittii* y *A. nosocomialis* (Kim et al., 2013); mientras que, la variante SIM-2 está presente en *P. aeruginosa* (Sun et al., 2016).

Las enzimas GIM y SPM son las metalo- β -lactamasas menos predominantes. Las enzimas son codificadas por genes que se encuentran principalmente en plásmidos. En la actualidad, la enzima GIM tiene dos variantes, las mismas que son endémicas de Alemania (Zhao y Hu, 2015). La variante GIM-1 fue reportada por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* (Castanheira, Toleman, Jones, Schmidt, y Walsh, 2004) aunque también se la ha encontrado en varias especies de la familia Enterobacteriaceae (Hamprecht et al., 2013; Kaase et al., 2014; Wendel et al., 2013), así como en aislados clínicos de *A. pittii* (Kaase et al., 2014). Recientemente, la variante GIM-2 se la ha encontrado en un aislado clínico de *Enterobacter cloacae* (Wendel y MacKenzie, 2015). Además, el gen que codifica la variante GIM-1 se localiza en plásmidos (Kaase et al., 2014); mientras que, el gen que codifica a la variante GIM-2 se lo encontró en un integrón del cromosoma (Wendel y MacKenzie, 2015). Finalmente, el gen SPM fue reportado por primera vez en la especie *P. aeruginosa* en Brasil (Poirel, Magalhaes, Lopes, y Nordmann, 2004); a partir de su aparición, los reportes en *Acinetobacter* spp. son escasos. Un estudio indicó la presencia de la enzima SPM en *A. baumannii* aislado de Irán (Shahcheraghi et al., 2011).

2.6. MECANISMOS DE RESISTENCIA

La resistencia microbiana puede ser natural o intrínseca y adquirida (Bernal, Molina-Santiago, Daddaoua, y Llamas, 2013; Madhavan y Murali, 2011; Orozco-Rico, 2011) aunque también se menciona un tercer tipo, la resistencia adaptativa (Bernal et al., 2013). La resistencia intrínseca constituye una característica inherente o funcional de algunas bacterias para combatir la acción de un determinado antibiótico (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, y Piddock, 2015; Orozco-Rico, 2011). La resistencia intrínseca está relacionada con características propias de las bacterias (Bernal et al., 2013; McDermott y White, 2011) más no con la presencia del antibiótico (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). En particular, la

presencia de varios genes presentes en el cromosoma bacteriano (Blair et al., 2015; Davies y Davies, 2010) que contribuyen directa o indirectamente a la inactivación de diferentes tipos de antibióticos como β -lactámicos, fluoroquinolonas o aminoglucósidos (Blair et al., 2015). Por otro lado, la resistencia adquirida puede ser el resultado de una alteración o mutación en los genes del cromosoma o por la incorporación de un elemento externo de la bacteria mediante transferencia horizontal del material genético (Bernal et al., 2013; Corona y Martínez, 2013; Guitian et al., 2012; Madhavan y Murali, 2011). Finalmente, la resistencia adaptativa es la capacidad de la bacteria de sobrevivir en presencia de antibióticos en donde sus genes se expresan dependiendo de las condiciones del medio (Bernal et al., 2013). Todos estos mecanismos de resistencia permiten la expresión de diferentes fenotipos de resistencia e incluso multirresistencia en bacterias (Bernal et al., 2013; Davies y Davies, 2010).

La resistencia antibiótica en *Acinetobacter* spp., igual que otras bacterias, puede ser intrínseca o adquirida (Doughari et al., 2011; Hammoudi et al., 2015). Las especies de *Acinetobacter* tienen la capacidad de combinar más de un mecanismo y generar multirresistencia a los antibióticos (Orozco-Rico, 2011; Papp-Wallace et al., 2011). Estos mecanismos de resistencia pueden variar entre especies, el tipo de antibióticos y la localización geográfica (Doughari et al., 2011). Entre los mecanismos intrínsecos principales se menciona a los siguientes: i) la alteración de la permeabilidad de la membrana externa, ii) expulsión del antibiótico por la presencia de bombas de eflujo y iii) la inactivación del fármaco mediada por la modificación enzimática (Bernal et al., 2013; Blair et al., 2015; Doughari et al., 2011; Orozco-Rico, 2011; Sen y Joshi, 2015).

2.6.1. Mecanismos de resistencia intrínsecos

2.6.1.1. Alteración de la permeabilidad

La alteración de la permeabilidad es un mecanismo de resistencia intrínseco que puede ser mediada por diferentes factores (Corona y Martinez, 2013). La impermeabilidad está dada por la composición y estructura del lipopolisacárido (LPS), así como de la expresión de las porinas, proteínas de la membrana externa (Omp, por sus siglas en inglés) (McDermott y White, 2011). En la alteración de la permeabilidad, las bacterias pueden cambiar su superficie mediante la modificación del lipopolisacárido (LPS), causando la reducción de las interacciones moleculares con el antibiótico; al mismo tiempo, aumenta la producción de vesículas que impiden la entrada del antibiótico a la célula (Corona y Martinez, 2013; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). Por otro lado, la baja regulación de las porinas promueve alteraciones en su número o tipo, generando una reducción de la permeabilidad de la membrana externa lo que impide la entrada del antibiótico (Blair et al., 2015; Corona y Martinez, 2013). Por lo tanto, este mecanismo es resultado de una modificación en los receptores específicos para los antimicrobianos o una alteración estructural de la membrana o pared celular (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013; McDermott y White, 2011).

La reducción en la expresión de las porinas contribuye a la resistencia de los antibióticos como carbapenémicos o cefalosporinas (Blair et al., 2015). En particular, los carbapenémicos utilizan las porinas para llegar al sitio blanco (Moreno, 2013; Papp-Wallace et al., 2011), su resistencia es mediada por una degradación enzimática (Blair et al., 2015). Sin embargo, en ausencia de carbapenemasas, la resistencia se da por mutaciones que reduce la producción de porinas o por porinas alteradas no funcionales (Blair et al., 2015; Moreno, 2013). La presencia de los carbapenémicos ejerce una presión selectiva a favor de la aparición de mutaciones en los genes de las porinas, así como en los genes que regulan la

expresión de las mismas (Blair et al., 2015). De esta manera se disminuye la cantidad de antibiótico en la bacteria, generando fenotipos resistentes (Moreno, 2013). Por ejemplo, en *Escherichia coli* se ha reportado una rápida acumulación de mutaciones en los genes relacionados con las porinas después de la exposición a carbapenémicos (Tängdén et al., 2013).

En *Acinetobacter* spp., la resistencia a los carbapenémicos está relacionada también con la pérdida de la expresión de las porinas (Evans et al., 2013; Gordon y Wareham, 2010; Hernández, García, Yagüe, y Gómez, 2010). Entre las porinas más importantes se menciona a CarO, proteína de 29 kDa (Abbott et al., 2013; Fonseca, Scheidegger, Freitas, Cipriano, y Vicente, 2013; Gordon y Wareham, 2010) y Omp33-36, proteína de 33-36 kDa (Abbott et al., 2013). En particular, la pérdida o reducción de la porina CarO está relacionada con la resistencia al imipenem más no al meropenem (Catel-Ferreira et al., 2011; Fonseca et al., 2013). En menor proporción, se menciona a las porinas OprD-like y OmpA; sin embargo, estas porinas están relacionadas con la resistencia a las cefalosporinas (Beceiro, Tomás, y Bou, 2013).

2.6.1.2. Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo es un mecanismo intrínseco de resistencia bacteriana (Blair et al., 2015; McDermott y White, 2011) mediado por un sistema proteico cuya función es transportar sustancias nocivas desde interior de la bacteria hacia el exterior (McDermott y White, 2011; Moreno, 2013). Si el antibiótico ingresa al citosol bacteriano es expulsado de la célula por medio de las bombas de eflujo (Corona y Martinez, 2013). Las bombas de eflujo funcionan en base a un mecanismo de contra-transporte iónico o por la hidrólisis de ATP como fuente de energía (McDermott y White, 2011; Moreno, 2013). La sobreexpresión de

las bombas de eflujo confiere una alta resistencia antibiótica (Blair et al., 2015; Sun, Deng, y Yan, 2014), la misma que puede ser resultado de mutaciones en los genes regulatorios que controlan la expresión, así como respuesta a señales ambientales (Blair et al., 2015; McDermott y White, 2011; Sun, Deng et al., 2014). Las proteínas que conforman la bomba de eflujo son codificadas por genes localizados a nivel cromosómico (Blair et al., 2015; Sun, Deng et al., 2014) aunque también se menciona genes presentes en plásmidos (Beceiro et al., 2013).

Las bombas de eflujo se clasifican en cinco familias tanto en bacterias Gram positivas como negativas (Venter, Mowla, Ohene-Agyei, y Ma, 2015). Esta clasificación se basa en las fuentes de energía y sustratos, así como en la composición y el número de regiones de transmembrana. Las familias son las siguientes: i) la familia de la resistencia-nodulación-división (RND, por sus siglas en inglés), ii) la superfamilia del ATP (adenosina trifosfato)-vinculante de *cassette* (ABC, por sus siglas en inglés), iii) la familia de resistencia a múltiples fármacos y extrusión compuesto tóxico (MATE, por sus siglas en inglés), iv) la familia de la resistencia a múltiples fármacos pequeña (SMR, por sus siglas en inglés) y v) la superfamilia facilitadora principal (MFS, por sus siglas en inglés) (Coyne, Courvalin, y McDermott y White, 2011; Périchon, 2011; Sun, Deng et al., 2014). De las cinco familias, cuatro se encuentran tanto en bacterias Gram positivas como negativas (Sun, Deng et al., 2014; Venter et al., 2015); mientras que, la familia RND se encuentra en el cromosoma (Lupo et al., 2012) de bacterias Gram negativas (Blair et al., 2015; Lupo et al., 2012; Sun, Deng et al., 2014; Venter et al., 2015). En especial en estas bacterias, las bombas de eflujo son un mecanismo importante para la resistencia antibiótica (Coyne et al., 2011).

El sistema RND, codificado cromosómicamente, es un canal proteico que atraviesa las membranas, externa e interna, así como el espacio periplásmico de la bacteria (Sun, Deng et

al., 2014). Este sistema emplea un gradiente de protones de membrana para expulsar el sustrato, intercambiando un hidrogenión (H^+) por una molécula del antibiótico (Venter et al., 2015). Además, este sistema es uno de los mecanismos de resistencia intrínseca de *Acinetobacter baumannii*, responsable de la multirresistencia antibiótica encontrada en la especie (Hernández et al., 2010; Sun, Deng et al., 2014; Venter et al., 2015). La resistencia mediada por este sistema se incrementa en presencia de otros mecanismos como la producción de carbapenemasas de la clase D (Coyne et al., 2011).

El principal mecanismo intrínseco de *Acinetobacter baumannii* constituye la bomba de eflujo *AdeABC* (Abbott et al., 2013; Esterly, Richardson, Eltoukhy, Qi, y Scheetz, 2011; Evans et al., 2013; Gordon y Wareham, 2010). Esta bomba de eflujo es codificada por tres genes cromosomales, *adeA*, *adeB* y *adeC*, los mismos que codifican el componente de fusión de la membrana, el transportador de antibiótico y la porina de membrana externa, respectivamente (Coyne et al., 2011; Esterly et al., 2011). El operón *adeRS* es regulado por los genes *adeR* y *adeS* (Coyne et al., 2011; Evans et al., 2013), en donde el gen *adeR* codifica para un regulador de respuesta, AdeR. Este regulador promueve a la codificación de la proteína represora que se unirá al operador de este sistema. En presencia del antibiótico, la proteína represora cambia estructuralmente lo que permite que se active el gen *AdeS* para que se inicie la transcripción de las proteínas de membrana del sistema *AdeABC* (Coyne et al., 2011; Sun et al., 2012). El sistema *AdeABC* tiene la capacidad de conferir resistencia a múltiples fármacos como a los aminoglucósidos, β -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, gliciliclinas como tigeciclina, macrólidos, cloranfenicol y trimetoprim. En particular, el sistema genera resistencia a los carbapenémicos como imipenem y meropenem (Coyne et al., 2011). Otras bombas de eflujo que se mencionan en *Acinetobacter* spp. son los sistemas *AdeIJK* y *AdeFGH*, los mismos que están relacionados con la resistencia a

varios antibióticos; en particular, el primer sistema media una resistencia a los carbapenémicos (Evans et al., 2013; Gordon y Wareham, 2010;).

2.6.1.3. Hidrólisis enzimática

La modificación enzimática es el principal mecanismo de resistencia antibiótica (Blair et al., 2015). Por medio de este mecanismo, las bacterias son capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que pierda su funcionalidad (Moreno, 2013). Varias enzimas tienen la capacidad de modificar o degradar antibióticos de diferentes tipos como los β -lactámicos (Blair et al., 2015). De acuerdo a la estrategia química, las enzimas que confieren resistencia pueden dividirse en tres grupos: i) enzimas de hidrólisis, ii) enzimas redox y iii) enzimas de transferencia (Gallo y Puglia, 2013).

Las enzimas de hidrólisis son aquellas cuya función es crear cambios en la estructura del antibiótico con el fin de que pierda su funcionalidad (Moreno, 2013). Estas enzimas degradan por hidrólisis los puentes de las aminas o ésteres presentes en los antibióticos (Tanwar et al., 2014). Entre las enzimas de hidrólisis se encuentran las β -lactamasas (McDermott y White, 2011; Moreno, 2013) cuya función es hidrolizar al anillo β -lactámico mediante la ruptura del enlace amida en los antibióticos que poseen esta estructura (McDermott y White, 2011; Palzkill, 2013; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). En *Acinetobacter* spp., el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos es la producción de enzimas β -lactamasas (Almasaudi, 2016; Beceiro et al., 2013; Hernández et al., 2010) ya sean intrínsecas o adquiridas. Por otro lado, aunque las enzimas redox no han sido muy estudiadas, estas enzimas tienen la capacidad de destruir al antibiótico mediante oxidación; en donde, una monooxigenasa cataliza la monohidroxilación de los antibióticos (Gallo y Puglia, 2013).

Las transferasas constituyen el grupo más grande de enzimas que promueven resistencia antibiótica (Gallo y Puglia, 2013). Estas enzimas se caracterizan porque transfieren grupos químicos a sitios vulnerables del antibiótico, inhibiendo la unión del mismo a su sitio blanco (Blair et al., 2015). Estas enzimas modifican los enlaces covalentes, dañando de esta manera la unión a la diana, mediante adenilación, fosforilación, acilación, glicosilación (Gallo y Puglia, 2013; Tanwar et al., 2014), nucleotidilación, ribosilación, la transferencia de grupo tiol (Gallo y Puglia, 2013) o hidroxilación (Tanwar et al., 2014). Las transferasas actúan en el citosol y requieren de cosustratos como de ATP, acetil coenzima A, nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenasa (NADH), difosfato de uridina (UDP) o glucosa (Gallo y Puglia, 2013). Finalmente, estas enzimas pertenecen a diferentes familias como acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas que tienen la capacidad de transferir grupos químicos como acil, fosfato, nucleotil y ribitol (Blair et al., 2015). Por ejemplo, la resistencia a los aminoglucósidos está mediada, principalmente, por la producción de la enzima la amoniglucósido-3'-fosfotransferasa VI que inactiva la amikacina (Gallo y Puglia, 2013).

2.6.2. Mecanismos de resistencia adquiridos

Acinetobacter spp. son bacterias multirresistentes debido a la acumulación de múltiples mutaciones y la adquisición de genes de resistencia procedentes de otros géneros bacterianos (Hernández et al., 2010; Poirel et al., 2011). En el género, las mutaciones puntuales pueden desarrollarse a lo largo del tiempo para generar resistencia (Hernández et al., 2010). Por otro lado, la transferencia de la resistencia en *Acinetobacter* spp. es mediana por distintos elementos como plásmidos, integrones, transposones (Perilli et al., 2015) o por competencia natural en la transformación genética (Almasaudi, 2016), en especial, para las cepas que son naturalmente competentes (Davies y Davies, 2010).

En particular, la adquisición de los genes *bla_{OXA}* constituye el mecanismo de resistencia más predominante de *Acinetobacter* spp. (Boo y Crowley, 2009). La expresión de las enzimas es mediada por integrones de clase uno, encontradas principalmente en *A. baumannii* (Perilli et al., 2015). Los integrones contienen las secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés) y un promotor que favorecen la expresión de los genes de resistencia (Krebs, Goldstein, y Kilpatrick, 2011). Por ejemplo, uno de los elementos de inserción más reportado en *Acinetobacter* spp. es el *ISAbaI* que es un elemento intrínseco móvil responsable de la expresión de los genes que codifican para las β -lactamasas (Adams, Chan, Molyneaux, y Bonomo 2010; Vanegas-Múnera et al., 2014). Este elemento al insertarse interrumpe la codificación de una proteína de membrana, generando un bloqueo en la entrada del antibiótico a la bacteria (Sun et al., 2012). En *A. baumannii*, el elemento *ISAbaI* ha sido identificado en la expresión de los genes *bla_{ADC-7}*, *ampC*, *bla_{OXA-23}* y *bla_{OXA-51}* (Adams et al., 2010; Jung y Park, 2015; Sun et al., 2012).

2.6.2.1. Mutaciones

El uso constante de antibióticos sintéticos ha generado un cambio en la evolución natural de las bacterias, generando poblaciones bacterianas resistentes (Beceiro et al., 2013). Esta resistencia antibiótica que adquieren las bacterias puede ser debido a la presencia de mutaciones en los genes cromosomales (Bernal et al., 2013), con una consecuente presión selectiva por la presencia continua de antibióticos (Hernández et al., 2010). Las mutaciones son resultado de alteraciones en la información genética de un organismo, las mismas que son heredables (Krebs et al., 2014). En particular, las mutaciones puntuales pueden generarse tanto de forma espontánea por errores en la replicación, pérdidas o desaminación de bases, así como de forma inducida por la presencia de mutágenos (Krebs et al., 2012).

Las mutaciones puntuales son las principales responsables de alterar los sitios diana de los antibióticos, disminuyendo la acción del mismo (Hernández et al., 2010). Este tipo de mutaciones son importantes para la supervivencia de las bacterias debido a que les provee una ventaja selectiva (Bernal et al., 2013). Sin embargo, algunas mutaciones son corregidas por el sistema de reparaciones la bacteria (Murray et al., 2014); mientras que, otras mutaciones consideradas como favorables son mantenidas por el sistema de reparación por error *mut* (Krebs et al., 2014). Las mutaciones que son mantenidas en el organismo pasan de generación en generación por la selección natural, incrementando la tasa de mutaciones como resultado se originan bacterias resistentes en pocas generaciones (Jouve, 2010). En particular, las mutaciones relacionadas con la resistencia antibiótica son seleccionadas gracias a la presión selectiva generada, principalmente, por el uso continuo de antibióticos (Bernal et al., 2013; Laxminarayan et al., 2013).

En *Acinetobacter* spp, las mutaciones en diferentes genes pueden generar resistencia a diferentes antibióticos. Por ejemplo, las mutaciones en determinados codones del gen *bla_{OXA-23-like}* han sido asociadas con un alto grado de resistencia a carbapenémicos, en particular, al imipenem (Bahador et al., 2015). Otras mutaciones, las que aparecen en el gen *AdeS* generan una proteína truncada que es la responsable de activar al gen *AdeR* (Sun et al., 2012), promoviendo una sobreexpresión del sistema *adeABC* (Gordon y Wareham, 2010; Sun et al., 2012). Por otro lado, mutaciones simultáneas en los genes *gyrA* y *parC* contribuyen a la alta resistencia a las fluoroquinolonas (Ardebili, Rastegar, Beheshti, y Rastegar, 2015); así como, las mutaciones puntuales que ocurren en algunos PBP, las asemeja a las β -lactamasas, producen la hidrólisis del anillo β -lactámico de los antibióticos (Rubtsova et al., 2010).

2.6.2.2. Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes es un proceso mediante el cual una bacteria transfiere su material genético a otra (Brooks et al., 2014), transferencia que puede ser entre bacterias de la misma especie o incluso entre especies distintas (Madhavan y Murali, 2011). Este proceso constituye uno de los mecanismos más importantes de evolución bacteriana debido a que las bacterias adquieren nueva información (Boto, 2010), la misma que le da una ventaja selectiva (Arber, 2014). Por lo que, la transferencia horizontal de genes es un mecanismo esencial para el desarrollo de la resistencia en bacterias (Beceiro et al., 2013). Las bacterias adquieren genes de resistencia mediante diferentes procesos como la conjugación, transducción y transformación (Arber, 2014; Blair et al., 2015; Finley et al., 2013; Krebs et al., 2014; Madhavan y Murali, 2011), así como también, por la incorporación de ADN mediante transposición, recombinación sitio específica u homóloga (Stokes y Gillings, 2011). Todos estos procesos involucran dos pasos: i) el movimiento físico del ADN y ii) la incorporación para su mantención estable (Stokes y Gillings, 2011), los mismos que son mediados por diferentes elementos genéticos. Entre los elementos genéticos que participan en el proceso son principalmente plásmidos, transposones, integrones (Bernal et al., 2013; Elsaied y Maruyama, 2011; Finley et al., 2013), bacteriófagos y el ADN desnudo (Bernal et al., 2013; Finley et al., 2013; Krebs et al., 2014) aunque también se menciona a *cassettes* genéticos y elementos de inserción (Stokes y Gillings, 2011).

En bacterias, el mecanismo más utilizado para la transferencia de genes de resistencia es la conjugación (Krebs et al., 2014), proceso en el cual existe contacto físico en sitios específicos entre dos bacterias (Koraimann y Wagner, 2014; Krebs et al., 2014). Este contacto promueve la formación de un puente plasmático, pili, por donde pasará el plásmido (Arber, 2014; Goering et al., 2013; Hartwell et al., 2011). El segundo mecanismo es la

transducción, en donde bacteriófagos lisogénicos insertan su genoma en el cromosoma bacteriano (Brooks et al., 2014; Krebs et al., 2014). La información genética incorporada en el cromosoma es transmitida de una bacteria a otra durante la replicación en cada ciclo celular (Krebs et al., 2014), lo que constituye la transferencia vertical de genes. El tercer proceso es la transformación que consiste en incorporar ADN exógeno que se encuentra en el ambiente como resultado de la lisis del organismo donador (Goering et al., 2013; Hartwell et al., 2011). El proceso puede llevarse a cabo de forma natural mediante la competencia natural o inducida que ocurre bajo condiciones de laboratorio (Brooks et al., 2014; Goering et al., 2013; Krebs et al., 2014).

2.6.2.2.1. Plásmidos

Los plásmidos son unidades de ADN extracromosomal que se transfieren de un microorganismo a otro de la misma especie o de diferentes especies (Noyd, Krueger, y Hill, 2014). Estos elementos extracromosomales son pequeños, de extremos libres, circulares, de doble cadena de ADN y se replican de forma independiente (Krebs et al., 2014; McDermott y White, 2011; Noyd et al., 2014). Por otro lado, los plásmidos o episomas que no tienen la capacidad de autoreplicación se integran al cromosoma bacteriano de forma reversible (Krebs et al., 2014). Los plásmidos pueden ser conjugativos que se movilizan por sí solos y los movilizables que adquieren elementos genéticos móviles como transposones o elementos de inserción (Carattoli, 2013; Krebs et al., 2014; McDermott y White, 2011). Los dos tipos de plásmidos son los responsables de una alta tasa de diseminación de los determinantes genéticos de resistencia en bacterias Gram negativas (Carattoli, 2013, McDermott y White, 2011). Los plásmidos transportan los genes encargados de la codificación de las carbapenemasas, así como, de genes necesarios para conferir resistencia a las principales

clases de antibióticos como quinolonas, β -lactámicos, aminoglucósidos, sulfonamidas, macrólidos, trimetopim, tetraciclina o cloranfenicol (Carattoli, 2013).

2.6.2.2.2. Integrones

Los integrones son elementos genéticos cuya función es capturar genes exógenos en forma de *cassettes* para convertirlos en genes funcionales, garantizando su correcta expresión (Cambray, Guerout, y Mazel, 2010; Elsaied y Maruyama, 2011; Gillings, 2014). Aunque el descubrimiento de los integrones fue en especies bacterianas clínicas, estos elementos también se encuentran en especies de diferentes entornos naturales debido a su capacidad de moverse entre diferentes especies (Elsaied y Maruyama, 2011; Gillings, 2014). Los integrones están conformados por el gen *intI*, codifica una integrasa (IntI), un sitio de recombinación *attI* y un promotor (Pc) (Gillings, 2014). Los genes, *cassettes* genéticos, son reconocidos por la integrasa, proteína encargada de realizar la recombinación del *cassette* genético en el sitio *attI* del integrón (Evans et al., 2013; Gillings, 2014). El *cassette* genético una vez que ha sido integrado se expresa por el promotor Pc (Cambray et al., 2010; Gillings, 2014). Los *cassettes* genéticos están constituidos por un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) y un sitio de recombinación *attC*, el mismo que es reconocido por la integrasa (Cambray et al., 2010) y es altamente variable, lo que aporta con su diversidad (Elsaied y Maruyama, 2011).

En bacterias Gram-negativas, la función de los integrones es la diseminación de la resistencia a los antibióticos; razón por la cual, estos elementos juegan un papel importante en la adaptación y evolución del genoma bacteriano (Elsaied y Maruyama, 2011; Gillings, 2014; Srivastava, 2013). Por lo que, los integrones pueden estar asociados plásmidos o a elementos móviles como los transposones con el fin de llevar los *cassettes* de resistencia antibiótica (Cambray et al., 2010; Palzkill, 2013). Los *cassettes* de resistencia confieren

resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas, entre otros (McDermott y White, 2011). Los integrones son de cinco clases, de los cuales el integrón de clase 1 es el de mayor importancia clínica (Cambray et al., 2010). En *Acinetobacter* spp., los integrones de clase 1 son los más reportados y son los encargados de conferir resistencia a varios antibióticos como cloranfenicol, β -lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas (Evans et al., 2013).

2.6.2.2.3. Transposones

Los transposones son elementos genéticos que tienen la capacidad de moverse a lo largo del genoma en forma independiente y autoreplicarse en el mismo (Fedoroff, 2012; Krebs et al., 2014). Los transposones se caracterizan por que tienen a cada extremo un elemento o secuencia de inserción (IS, por sus siglas en inglés) que encierran la región central formada por uno o varios genes (Brooker, 2012; Krebs et al., 2014; Russell, Hertz, y McMillan, 2015) que pueden ser de resistencia antibiótica. Las secuencias de inserción son unidades autónomas con capacidad de transposición que se encuentran como repeticiones terminales invertidas idénticas en los extremos de los transposones (Krebs et al., 2014; Russell et al., 2015). Estas secuencias tienen su propio gen que codifica la enzima transposasa que es la responsable de su actividad de transposición (Brooker, 2012; Krebs et al., 2014; Russell et al., 2015). Por lo tanto, los elementos o secuencias de inserción son las responsables de mover al transposón de un lugar a otro diferente dentro del cromosoma bacteriano (Krebs, et al., 2012; Krebs, et al., 2014). Las secuencias de inserción no solo pueden estar en transposones del cromosoma bacteriano sino también en transposones presentes en plásmidos (Krebs, et al., 2014). Por lo que, algunos transposones no solo pueden transferir los determinantes genéticos de resistencia a los antibióticos (Brooker, 2012; Krebs et al., 2014; Russell et al., 2015) dentro del cromosoma sino también entre plásmidos y entre plásmido y el cromosoma bacteriano (McDermott y White, 2011; Pérez-Cano y Robles-

Contreras, 2013). Por lo tanto, los transposones junto con las secuencias de inserción generan una rápida evolución como resultado de la presión selectiva (Stokes y Gillings, 2011), promoviendo de esta manera la evolución del genoma bacteriano (Fedoroff, 2012).

2.7. IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

2.7.1. Detección fenotípica de la resistencia antibiótica

Para la identificación de bacterias resistentes como *Acinetobacter* spp. existen medios selectivos, uno de los más utilizados es el *CHROM AGAR Acinetobacter* (Rambach, 2015). El medio se basa en la coloración de las colonias debido a la presencia de un cromógeno que es activado cuando la enzima de la bacteria se une al sustrato del medio; como resultado, el cromóforo se libera exhibiendo el color distintivo en la placa (Rambach, 2014). Para la detección de *Acinetobacter* spp. multirresistente, el medio *CHROM AGAR* contiene un suplemento que ayuda al crecimiento de aislados con actividad enzimática de β -lactamasas (Rambach, 2015).

La detección fenotípica de la resistencia antibiótica es un método útil para la identificación de un mecanismo de resistencia a los antibióticos (Thirapanmethee, 2012), en particular, de las carbapenemasas (Nordmann et al., 2011). Entre los métodos están la difusión de disco o antibiograma (Balouiri, Sadiki, y Ibnsouda, 2015; Marsik, 2011; Nordmann et al., 2011), el efecto sinérgico, los sistemas automatizados (Nordmann et al., 2011) y las tirillas gravimétricas (Marsik, 2011). Algunas técnicas están sujetas a estandarización por el Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos (CLSI, por sus siglas en inglés) y el Comité Europeo en Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés) (Balouiri et al., 2015).

El método de Kirby Bauer o la difusión en disco es el método de referencia para la detección de resistencia bacteriana (Balouiri et al., 2015). Este método consiste en evaluar la zona de inhibición del agente antimicrobiano a una concentración establecida frente a un inóculo estandarizado de un microorganismo; por lo general, esta prueba se realiza en agar *Muller-Hinton* (Balouiri et al., 2015; CLSI, 2015). De acuerdo al CLSI (2015), para *Acinetobacter* spp., los antibióticos de obligación a evaluar y reportar son meropenem, imipenem, ceftazidime y gentamicina; sin embargo, los antibióticos que también deben ser probados son piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam, cefepime y trimetoprim/sulfometroxazol, aunque su reporte no sea específico.

En la prueba del efecto sinérgico se evalúa la sinergia que es el resultado de una combinación e interacción de dos o más agentes antimicrobianos (Breitinger, 2012; Marsik, 2011), en donde el efecto combinado genera una fuerza o antagonismo entre ellos (Breitinger, 2012). Entre las pruebas de sinergia más utilizadas se encuentran la prueba de *Hodge* y la sinergia de disco combinado (Navarro et al., 2011; 2015; Wei et al., 2015). La prueba de *Hodge* es un método fenotípico que sirve para la detección de carbapenemasas en Gram negativas (Vanegas-Múnera et al., 2014); en donde, la cepa productora de estas enzimas inactiva el carbapenémico probado. Por otro lado, la prueba de disco combinado consiste en la detección de β -lactamasas en donde existe una mayor ampliación del halo de inhibición alrededor del disco de β -lactámico más un inhibidor frente al disco del β -lactámico sin inhibidor (CLSI, 2015).

En *Acinetobacter* spp., la prueba de sinergia de doble disco evalúa la presencia de metalo- β -lactamasas y serin- β -lactamasas (Navarro et al., 2011). Para la detección de las enzimas metalo- β -lactamasas se usa un carbapenémico y un disco impregnado del reactivo EDTA. En la prueba, se coloca el carbapenémico a una distancia de 1,5 a 2 mm del disco

impregnado con EDTA (CLSI, 2015; Navarro et al., 2011; Vanegas-Múnera et al., 2014). El fundamento de la técnica es el uso de EDTA, quelante, que va interactuar con el sitio activo en donde se encuentra el ión zinc (Vanegas-Múnera et al., 2014). Por otro lado, para determinar la presencia de las enzimas serin- β -lactamasas se usa un disco impregnado con ácido borónico y un disco de carbapenémico (Navarro et al., 2011). Finalmente, para evaluar la presencia de carbapenemasas de tipo OXA no es posible utilizar los métodos fenotípicos mencionados debido a que no existen inhibidores específicos para estas enzimas (Navarro et al., 2011; Wei et al., 2015), por lo que, su detección es a nivel molecular.

2.7.2. Detección molecular de la resistencia antibiótica

Para la identificación de los genes de resistencia presentes en una bacteria se usa diferentes técnicas moleculares (Marsik, 2011; Vanegas-Múnera et al., 2014; Wei et al., 2015). Los métodos más utilizados en detección de genes de resistencia son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y el secuenciamiento (Thirapanmethee, 2012; Vanegas-Múnera et al., 2014). La técnica de PCR consiste en una reacción enzimática que da como resultado la amplificación exponencial de una determinada región del ADN (Brooker, 2012; Krebs et al., 2014). El proceso consiste en el cambio de temperaturas que ocurren en ciclos y consta de tres pasos principales: desnaturalización, hibridación y extensión (Green y Sambrook, 2012; Krebs et al., 2014; Peña-Castro, Gregorio-Ramírez, y Barrera-Figueroa, 2013). En la desnaturalización, a una alta temperatura (90-95°C) se promueve la separación de las cadenas de ADN. En el segundo paso, los *primers*, secuencias cortas de ADN, se hibridan con las cadenas del ADN abiertas, flanqueando la zona que se va amplificar. La hibridación de los *primers* dependerá de la temperatura de fusión de cada *primer* (T_m). Finalmente, en la extensión, la enzima ADN

polimerasa sintetiza las nuevas cadenas de ADN en dirección 5'- 3' a partir del extremo 3'OH a una temperatura de 72°C (Green y Sambrook, 2012; Krebs et al., 2014).

En *Acinetobacter* spp., las variantes de PCR como la PCR en tiempo real y la PCR múltiple son las más empleadas para la detección de genes de resistencia que codifican para las carbapenemasas del tipo serin- β -lactamasas y metalo- β -lactamasas (Kamolvit et al., 2014; Routray et al., 2013; Turton, Gabriel, Valderrey, Kaufmann, y Pitt, 2007; Yang y Rui, 2016). La PCR múltiple es una variante de la PCR convencional con la diferencia que en la reacción se emplea múltiples *primers* para la amplificación simultánea de dos o más regiones de ADN (Green y Sambrook, 2012). Los *primers* que se utilizan en la PCR múltiple deben tener una temperatura de hibridación similar y que no sean complementarios entre ellos para que se dé una correcta amplificación (Green y Sambrook, 2012; Loeffelholz y Dong, 2013). Mientras que, la PCR en tiempo real consiste en una amplificación en donde el producto es monitoreado durante el proceso; para lo cual, se usa sondas o colorantes fluorescentes (Brooker, 2012; Green y Sambrook, 2012). La fluorescencia incrementa en una proporción directa a la cantidad del producto de PCR (Loeffelholz y Dong, 2013).

La secuenciación del ADN es un método molecular que permite conocer el orden de los nucleótidos de una secuencia (Mardis, 2013; Peña-Castro et al., 2013), de esta forma se provee información sobre la estructura y función (Pierce, 2012). El secuenciamiento puede ser de primera y de la siguiente generación (*Next sequencing*) (Mardis, 2013; Metzker, 2010). En el secuenciamiento de primera generación se incluye dos tipos: el secuenciamiento de Maxam-Gilber y el Sanger. El secuenciamiento de Maxam-Gilber es un método no enzimático; mientras que, el de Sanger es enzimático (Metzker, 2010; Morey et al., 2013). En el método de Sanger, descrita en 1977, se emplea nucleótidos modificados conocidos como dideoxinucleótidos (ddNTPs). Los ddNTPs se caracterizan porque estructuralmente

carece del grupo 3'OH (Mardis, 2013; Morey et al., 2013; Pierce, 2012), lo que impide la elongación del producto; por lo tanto, cuando se incorpora un ddNTP se queda un fragmento de ADN incompleto (Peña-Castro et al., 2013). Los ddNTPs marcados se incorporan al azar, generando una población que se diferencia en una sola base (Morey et al., 2013; Pierce, 2012). Los productos de la secuenciación migran mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante en donde se diferencian los productos por un nucleótido (Mardis, 2013; Peña-Castro et al., 2013). Esta técnica es muy utilizada para la confirmación de los genes de resistencia, así como para su correcta clasificación (Thirapanmethee, 2012).

2.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

La filogenia es el estudio de las relaciones entre especies que comparten un ancestro común (Patwardhan, Ray, y Roy, 2014; Yang y Rannala, 2012) pero también describe las relaciones entre una familia de genes, evolución, así como dinámica de los patógenos, entre otros (Yang y Rannala, 2012). Por lo tanto, el análisis filogenético tiene como función estimar el origen que exprese el proceso evolutivo y descendencia de un grupo taxonómico (Peña, 2011). Para lo cual, las relaciones filogenéticas de un organismo o genes se basa en la comparación secuencias homólogas de ADN, ARN o aminoácidos. Al comparar las secuencias se establece un nivel de disimilaridad, la misma que se expresa como divergencia genética (Patwardhan et al., 2014).

Las relaciones filogenéticas se manifiestan de forma gráfica como un árbol filogenético (Patwardhan et al., 2014; Yang y Rannala, 2012). Primero, para el análisis se determina el mejor modelo evolutivo que da una idea del proceso evolutivo. Uno de los modelos es el de *Jukes-Cantor* (JC) que asume que tanto purinas como pirimidinas son sustituidas en igual proporción (Patwardhan et al., 2014). Una vez que se determina el mejor

modelo evolutivo se escoge el método de construcción, el mismo que es de dos tipos, en base a caracteres y de distancia (Patwardhan et al., 2014; Yang y Rannala, 2012). Los métodos en base a caracteres toman en cuenta eventos acumulados en la secuencia, considerando el estado ancestral (Patwardhan et al., 2014). Entre estos métodos se mencionan: i) máxima parsimonia (MP), ii) máxima verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) y la iii) inferencia bayesiana (IB) (Peña, 2011; Yang y Rannala, 2012). Por otro lado, los métodos de distancia calculan la distancia observada después de corregirla usando diferentes modelos. Entre los métodos de distancia se encuentran *Neighbor joining*, *Minimum evolution*, entre otros. Finalmente, el árbol filogenético es evaluado mediante diferentes pruebas estadísticas como *bootstrap*, Kishino-Hasegawa, entre otros (Patwardhan et al., 2014).

Entre los métodos en base a caracteres, el método de máxima parsimonia se caracteriza por que utiliza el mínimo de cambios y asume cualquier carácter heredable como una homología potencial (Peña, 2011); mientras que, los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana se basan no solo en el cambio evolutivo sino también en la aplicación general de estadística (Patwardhan et al., 2014; Peña, 2011). Estos dos métodos utilizan los caracteres moleculares para estimar la probabilidad. El método ML estima la probabilidad de qué tan bien está la matriz de caracteres, la misma que es explicada por los árboles filogenéticos (Peña, 2011); mientras que, en inferencia bayesiana se asignan los parámetros en una distribución *a priori*, los cuales son combinados para generar una distribución posterior (Yang y Rannala, 2012). La simulación bayesiana se basa en el uso *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) que es proceso que involucra miles de pasos de remuestreo (Patwardhan et al., 2014). Por esto, se establece que todas las inferencias relativas a los

parámetros se basan en la distribución posterior que permite interpretar como la probabilidad de que el árbol es correcto (Yang y Rannala, 2012).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio

El estudio fue de tipo exploratorio y explicativo. De tipo exploratorio porque se buscó la presencia de las enzimas carbapenemasas en *Acinetobacter* spp. de aislados clínicos y ambientales de la ciudad de Quito, información que no ha sido reportada anteriormente en la mencionada ciudad. Además, el tipo de investigación fue explicativa debido a que se describió molecularmente los genes presentes tanto en aislados clínicos, así como ambientales. Finalmente, se infirió la relación de los genes presentes en los dos tipos de aislados.

3.2. Procedencia de las muestras

3.2.1. Aislados clínicos

Para el estudio se utilizó cincuenta y dos aislados de *Acinetobacter* spp. procedentes de varias muestras clínicas de cuatro diferentes hospitales de la ciudad de Quito. Los aislados clínicos fueron proporcionados por el INSPI-Quito. En el estudio se incluyó los aislados clínicos reportados y disponibles en la base de datos de la mencionada institución durante el periodo enero-diciembre del 2015. Los análisis tanto microbiológicos como moleculares fueron procesados en el Laboratorio del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Quito. Los datos de cada aislado se detallan en el Anexo 1.

3.2.2. Colección de muestras ambientales

Las muestras ambientales fueron colectadas de cinco ríos, Monjas, Machángara, San Pedro, Pita y Guayllabamba de la ciudad de Quito. La toma de muestras fue realizada en dos salidas diferentes. En la primera salida, se muestreó tres sitios diferentes de los ríos Monjas, Machángara y San Pedro. En la segunda salida, se muestreó tres sitios adicionales de los ríos

Monjas, Machángara y San Pedro, además, se incluyó el muestreo de seis puntos diferentes del río Pita y tres del río Guayllabamba. Estos ríos fueron escogidos debido a que son los más representativos de la ciudad y porque parte de su curso pasa cerca de viviendas, excepto el curso del río Guayllabamba que pasa fuera de la ciudad. Las muestras fueron colectadas cerca de viviendas porque existe mayor susceptibilidad de contaminación. Las muestras fueron recolectadas de acuerdo a los criterios establecidos en el estudio de Zhang et al. (2013) y el protocolo de *Global Sewage Surveillance Project* (2016) con ligeras modificaciones. Para lo cual, en un envase plástico estéril, se colectó una muestra representativa de 100 ml del centro de la corriente de cada río (Zhang et al., 2013). Las muestras fueron tomadas a una profundidad de alrededor 15 a 20 cm y en sentido opuesto a la corriente del recurso hídrico (Protocolo *Global Sewage Surveillance Project*, 2016; Anexo 2).

Las muestras fueron etiquetadas con la fecha, lugar, número de muestra y punto GPS del sitio de colección (Anexo 3) e inmediatamente transportadas en condiciones refrigerantes para su procesamiento. El análisis microbiológico se lo llevó a cabo en el Laboratorio del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los antimicrobianos del INSPI-Quito; mientras que, los análisis moleculares fueron desarrollados en el laboratorio de Ecología y Genética de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

3.3. Control de calidad

3.3.1. Control de calidad de los medios de cultivo

Para evaluar la esterilidad de los medios se realizó un control de calidad. Primero, se evaluó la sangre de cordero, para esto se inoculó una gota de sangre en medio *Muller Hinton* y otra gota en medio tripticasa soya, los mismos que fueron incubados a 37°C por 24 horas.

Por otro lado, los medios preparados de agar sangre de cordero, MacConkey y *CHROM AGAR Acinetobacter* se incubaron a 37°C por 24 horas. Adicionalmente, para evaluar la selectividad del medio *CHROM AGAR Acinetobacter* se sembraron varias cepas ATCC para poder diferenciar a los aislados de *Acinetobacter* spp. de otras especies que presentan un crecimiento con la misma coloración, además se incluyó controles para diferenciar entre enterobacterias y bacterias no fermentadoras. Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705 fueron inoculadas para evidenciar el crecimiento de color azul que debe dar por la presencia de enterobacterias; mientras que, el aislado de *A. baumannii* con código de identificación-INSPI-Quito 15-0669 fue sembrado como control para la detección de colonias con un crecimiento rojo. Por otro lado, se sembraron cepas no fermentadoras como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para diferenciarlas de las colonias de *Acinetobacter* spp. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

Por otro lado, a cada lote preparado del medio *Muller Hinton* se realizó el control de calidad según los parámetros del CLSI (2015) y el Protocolo de trabajo Red Whonet de Argentina (2014) que se describen a continuación. El pH del medio se evaluó con un pHmetro de sensibilidad de $\pm 0,01$ unidades de pH, esperando un rango que fue de 7,3 a 7,4 de pH. La profundidad del agar se la valoró con un calibrador para determinar los 4 mm de profundidad recomendados por el protocolo. Por otro lado, para el análisis del contenido de cationes Ca^{++} y Mg^{++} se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente al disco de gentamicina, un aminoglucósido. La misma cepa bacteriana en conjunto con el disco de imipenem fue usada para determinar el contenido de Zn en el agar. El contenido de timidina se detectó mediante el uso de una cepa control *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 que se probó frente al disco de trimetoprim/sulfametoxazol. Los resultados obtenidos en

cada parámetro fueron analizados de acuerdo a los criterios establecidos por el CLSI (2015) para el control de calidad de la prueba de difusión de discos.

3.3.2. Control de calidad de los discos

Los antibióticos utilizados en el estudio y que se detallan en el punto 3.5 fueron evaluados antes de su uso para la prueba de la sensibilidad tanto de los aislados clínicos como ambientales. Para el control de los discos se utilizaron dos cepas ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Para cada cepa ATCC, el diámetro de inhibición con cada antibiótico debió estar dentro del rango permitido de acuerdo a los lineamientos del CLSI (2015).

3.4. Aislamiento e identificación de *Acinetobacter* spp.

Los aislados clínicos disponibles en la base de datos del INSPI-Quito fueron reactivados en agar sangre de cordero. Una vez que se verificó la calidad del medio se sembró los aislados y se los dejó incubar por 24 h a 37°C. Cuando se evidenció crecimiento bacteriano se preparó dos alícuotas: i) una en BHI + Glicerol para su almacenamiento y ii) otra en agua estéril (500 µl) para la extracción del ADN. Las colonias fueron identificadas a nivel de género en base a sus características microscópicas y bioquímicas de acuerdo a Gupta et al. (2015).

Para los aislados ambientales se procedió de acuerdo a los lineamientos sugeridos por Zhang et al. (2013) con ligeras modificaciones. Para lo cual, 100 ml de agua de cada río fueron centrifugados a $1\ 000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue decantado, el pellet resultante de cada muestra fue resuspendido en 5 ml de medio líquido tioglicolato e incubado por 24 horas. El crecimiento microbiano fue evaluado a 37°C. De la mezcla se tomó 30 µl, la misma que fue sembrada en el agar selectivo

CHROM AGAR Acinetobacter. Las colonias que crecieron con un pigmento rojo en el medio selectivo fueron seleccionadas para la identificación preliminar de *Acinetobacter* spp. A las colonias seleccionadas se les realizó una tinción Gram y pruebas bioquímicas como oxidasa, catalasa y motilidad (Gupta et al., 2015). La mayoría de los aislados sospechosos procedentes se los identificó mediante el sistema automatizado *VITEK-2* (Biomérieux).

3.5. Pruebas de sensibilidad

Las pruebas de susceptibilidad antibiótica de *Acinetobacter* spp. tanto de los aislados clínicos como ambientales se determinó por el método de difusión en disco utilizando el agar *Muller Hinton* en base a los criterios descritos por CLSI (2015) y el Protocolo de trabajo *Red Whonet* de Argentina (WHONET, 2014). Para el análisis, se trabajó con cada aislado bacteriano a una concentración de 0,5 de acuerdo a la escala de MacFarland. Los discos antibióticos utilizados fueron los siguientes: ampicilina/sulbactam (20 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacina (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), cefepime (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (25 µg), piperacilina/tazobactam (110 µg) y tobramicina (30 µg). Las cajas fueron incubadas por 24 horas a 37°C tanto para aislados clínicos como ambientales. Los puntos de corte para considerar a cada antibiótico como resistente, intermedio o sensible fueron de acuerdo a los lineamientos del CLSI (2015), los mismos que se detallan en el Anexo 4.

Para la determinación de las enzimas metalo-β-lactamasas y serin-β-lactamasas se realizaron las pruebas de monodiscos de EDTA y ácido borónico, respectivamente (CLSI, 2015). Para evaluar la sinergia que se produce entre el reactivo EDTA y los carbapenémicos, se colocaron dos discos, imipenem (10 µg) y meropenem (10 µg), a una distancia de 2 cm al centro del disco con EDTA (5 µg). Para observar la sinergia que se produce entre el ácido

borónico y el carbapenémico, se colocó el disco de imipenem a una distancia de 2 cm al centro del disco con ácido borónico (5 µg) (WHONET, 2014).

3.6. Análisis molecular

3.6.1. Extracción de ADN

Una vez identificados los aislados a nivel de género y obtenido el perfil fenotípico de resistencia a los carbapenémicos y otras familias de antibióticos se realizó una suspensión bacteriana para la extracción de ADN. La extracción de ADN genómico total fue de acuerdo a los parámetros de Cuaical, Delgado, Anzola, Marcano, y Torres (2012) que se detalla a continuación. Primero, se procedió con la lisis celular, para lo cual se colocó dos colonias en 500 µl de agua destilada estéril y se lo dejó en ebullición durante 15 min. Posteriormente, la solución fue centrifugada por 2 minutos a 10 000 rpm. El sobrenadante obtenido se lo transfirió a otro microtubo de 1,5 ml. Finalmente, el ADN obtenido se lo cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el equipo *Nanodrop* y se lo conservó a -20 °C para su posterior amplificación.

3.6.2. Amplificación de los genes de resistencia

Para la identificación de los genes de resistencia se amplificaron nueve regiones parciales de genes que codifican para las diferentes enzimas carbapenemasas mediante PCR. Las regiones amplificadas fueron seis genes que codifican las enzimas del tipo serin-β-lactamasas, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* y *bla_{OXA-143}* y tres genes que codifican a las metalo-β-lactamasas, *bla_{SPM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{GIM}*. Las secuencias de los *primers* que se escogieron para la amplificación de los genes de resistencia se detallan en Anexo 5.

La reacción de PCR fue en un volumen final de 25 µl, la misma que contenía 12,5 µl de *GoTaq® Green Master Mix* 1X (Promega, 2012), 10,5 µl de agua molecular, 0,5 µl de cada *primer forward* y *reverse* (10 µM) y 1 µl de ADN a una concentración de 50 ng/µl. En la reacción de PCR, se incluyó tres controles: i) un control positivo para los genes de resistencia *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58}, ii) un control negativo que fue el agua de PCR y iii) un control interno para los genes *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{GES}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM} y *bla*_{SIM}. Para la amplificación de los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51} se utilizó como control positivo a *Acinetobacter baumannii* INH 221781 y para el gen *bla*_{OXA-58} se dispuso de *A. baumannii* INH 628504. Por otro lado, el control interno se usó para descartar problemas a nivel de reacción debido a que no se disponía de control positivo para algunos genes. El control interno para las pruebas de los genes *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{GES} y *bla*_{SIM} fue *A. baumannii* INH 221781; mientras que, *A. baumannii* INH 628504 fue control interno para el gen *bla*_{SPM}. Una vez que se obtuvo un producto de PCR para los genes *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{GES} y *bla*_{SIM} se utilizó el aislado 15-1175 como control positivo. El aislado positivo 15-1175 positivo para el gen *bla*_{SIM} se lo utilizó como control interno para la amplificación del gen *bla*_{GIM}.

Las condiciones de la PCR para los genes *bla*_{SPM}, *bla*_{GES}, *bla*_{SIM} y *bla*_{GIM} fueron las reportadas por Ellington et al. (2007) con ligeras modificaciones. Las condiciones fueron las siguientes: una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 52,8°C por 40 segundos y una extensión a 72°C por 50 segundos; finalmente, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Por otro lado, las condiciones de la PCR para los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} y *bla*_{OXA-143} fueron las reportadas por Woodford et al. (2006) con ligeras modificaciones. Las condiciones fueron las siguientes: una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de

30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 53°C por 30 segundos, y una extensión a 72°C por 30 segundos; finalmente, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para la amplificación del gen *bla*_{OXA-58} se utilizó la temperatura de *annealing* de 60°C, la misma que se determinó mediante un análisis de gradiente. Los productos de PCR migraron en gel de agarosa al 2 % teñido previamente con *Gelstar*TM *Nucleic Acid Gel Stain* 10 000 X (Lonza) para su visualización mediante UV.

3.6.3. Purificación y secuenciamiento de las muestras

Los productos de PCR fueron purificados con *exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase* (ExoSap-IT®) para enviar a secuenciar. En un volumen de 20 µl, se colocó 1 µl de la enzima y se siguió las instrucciones del fabricante (USB Corporation, 2005). El protocolo consistió en una incubación a 37 °C por 30 minutos y 80 °C por 15 minutos. Todos los productos de PCR de los aislados clínicos que resultaron positivos para los genes *bla*_{SIM} (n = 1), *bla*_{SPM} (n = 7), *bla*_{GES} (n = 6), *bla*_{OXA-24} (n = 6) y *bla*_{OXA-143} (n = 1) se enviaron a secuenciar. Mientras que, el producto de PCR de los genes *bla*_{OXA-58} (n = 18), *bla*_{OXA-51} (n = 23) y *bla*_{OXA-23} (n = 23) se seleccionaron tomando en consideración el tipo de muestra y servicio de hospitalización. Para los aislados ambientales, se enviaron a secuenciar todos los productos de PCR que fueron positivos para los genes *bla*_{SPM} (n = 2), *bla*_{OXA-58} (n = 3) y *bla*_{OXA-51} (n = 10). Los productos de PCR fueron enviados a MacroGen, Corea, para su secuenciación con los dos *primers forward* como *reverse*.

Las dos secuencias *forward* y *reverse* fueron alineadas manualmente con el *software Clustal W* implementado en el programa MEGA 7 (Kumar, Stecher, y Tamura, 2016) para su edición y limpieza con el propósito de obtener una sola secuencia consenso. La identificación de las secuencias obtenidas se realizó mediante una comparación entre las

secuencias disponibles en la base de genes *GenBank* utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997). La identidad de la secuencia fue evaluada tomando en consideración el porcentaje de identidad entre las secuencias. El número de haplotipos de los genes, en particular del gen *bla*_{OXA-51}, fue determinado con el programa *DnaSP* v.5.10 (Rozas, Librado, Sánchez-DelBarrio, Messenguer, y Rozas, 2010).

3.7. Análisis de datos

3.7.1. Análisis estadísticos

El análisis de datos se basó en una estadística descriptiva para calcular la frecuencia de los genes de resistencia. Los datos del perfil de resistencia fueron tabulados en el *software* libre WHONET versión 5.6 (WHONET, 2016). Los resultados fueron expresados en diagrama de barras y pastel elaborados en el programa WHONET y EXCEL (Microsoft, 2016). Las diferencias entre los genes de resistencia a los carbapenémicos entre los tipos de muestras fueron analizadas mediante la prueba exacta de *Fisher* con un nivel de significancia estadística de un valor p 0,05. Este análisis se lo escogió debido a la diferencia entre el tamaño de muestra, en particular del número de aislados ambientales obtenidos. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa SPSS Versión 23 (IBM, 2015).

3.7.2. Análisis filogenéticos

Para realizar el análisis filogenético, se incluyó los haplotipos ($n = 8$) de los genes *bla*_{OXA-23} ($n = 1$), *bla*_{OXA-72} ($n = 1$), *bla*_{OXA-51} ($n = 5$) y *bla*_{OXA-143} ($n = 1$) identificados en el presente estudio. Además, se añadió secuencias de las variantes de los diferentes genes *bla*_{OXA} ($n = 45$) disponibles en la base de datos *GenBank*. Las secuencias de las variantes que se incluyeron fueron de los genes *bla*_{OXA-23} ($n = 4$), *bla*_{OXA-24} ($n = 7$), *bla*_{OXA-51} ($n = 28$) y *bla*_{OXA-143} ($n = 6$) (Anexo 6). Debido a la diferencia en el tamaño de las secuencias se

elaboró dos árboles filogenéticos: i) un árbol con secuencias de tamaño de 333 pb y ii) un árbol con secuencias de 205 pb. En el primer árbol, se elaboró con secuencias de los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-143}; en este análisis no se incluyó el gen *bla*_{OXA-24} del presente estudio, pero sí secuencias obtenidas del *GenBank*. Por otro lado, el segundo árbol fue construido con las secuencias de los genes *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-143}; en este análisis no se incluyó el gen *bla*_{OXA-51} del presente estudio, pero sí secuencias obtenidas del *GenBank*. Las secuencias de las variantes OXA-58 de *Acinetobacter baumannii* (número de acceso *GenBank* JQ409994.1) y OXA-10 de *Pseudomonas aeruginosa* (número de acceso *GenBank* GU367339.1) fueron usadas como grupo externo para el análisis de los genes *bla*_{OXA} de un tamaño de 333 pb; mientras que, para el análisis de las secuencias con un tamaño de 205 pb se usó solo la secuencia de la variante OXA-58 de *A. baumannii* (número de acceso *GenBank* JQ409994.1).

Las secuencias de los genes codificantes fueron divididas en tres particiones considerando la primera, segunda y tercera posiciones del codón (Shapiro, Rambaut, y Drummond, 2006). Las matrices de las diferentes particiones para buscar el mejor modelo evolutivo y la matriz utilizada para los análisis filogenéticos fueron elaboradas en el programa Mesquite (Maddison y Maddison, 2014). El mejor modelo evolutivo fue estimado en base al criterio *Akaike Information Criterion* corregido (AICc), el mismo que fue inferido usando el programa jModelTest v.2.1.4 (Darriba, Taboada, Doallo, y Posada, 2012).

La inferencia bayesiana se lo realizó utilizando el programa MrBayes v.3.2.2 (Ronquist et al., 2012). Las probabilidades posteriores de los árboles de acuerdo al modelo evolutivo fueron aproximadas con el modelo de Monte Carlo por Cadena de Markov (MCMC, por sus siglas en inglés). Para el análisis se realizó una corrida de 2 000 000 generaciones, 200 000 de *burn in* y muestreadas cada 5 000 generaciones. Para asegurar la convergencia de la

distribución posterior y los parámetros, los valores del tamaño efectivo de la muestra (ESS, por sus siglas en inglés) fueron evaluados usando el programa Tracer v.1.6 (Rambaut, Suchard, y Drummond, 2013). Los árboles filogenéticos obtenidos fueron visualizados y editados usando el programa FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014). Para la edición final de los árboles se usó el programa de edición GIMP v 2.8.16 (GIMP Team, 2016).

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación microbiológica de *Acinetobacter* spp.

4.1.1. Aislados clínicos

Las muestras clínicas (75 %) provienen principalmente de la población pediátrica seguido de la población adulta (21,15 %); mientras que, la población de neonatología y desconocida, cada una representa un porcentaje bajo del 1,92 %. En cuanto al tipo de muestra, la secreción traqueal fue la más frecuente (30,8 %) (Figura 1). A nivel de servicio se encontró un mayor número de aislados en la unidad de cuidados intensivos (30,8 %) de los diferentes hospitales de donde se obtuvieron las muestras (Figura 2).

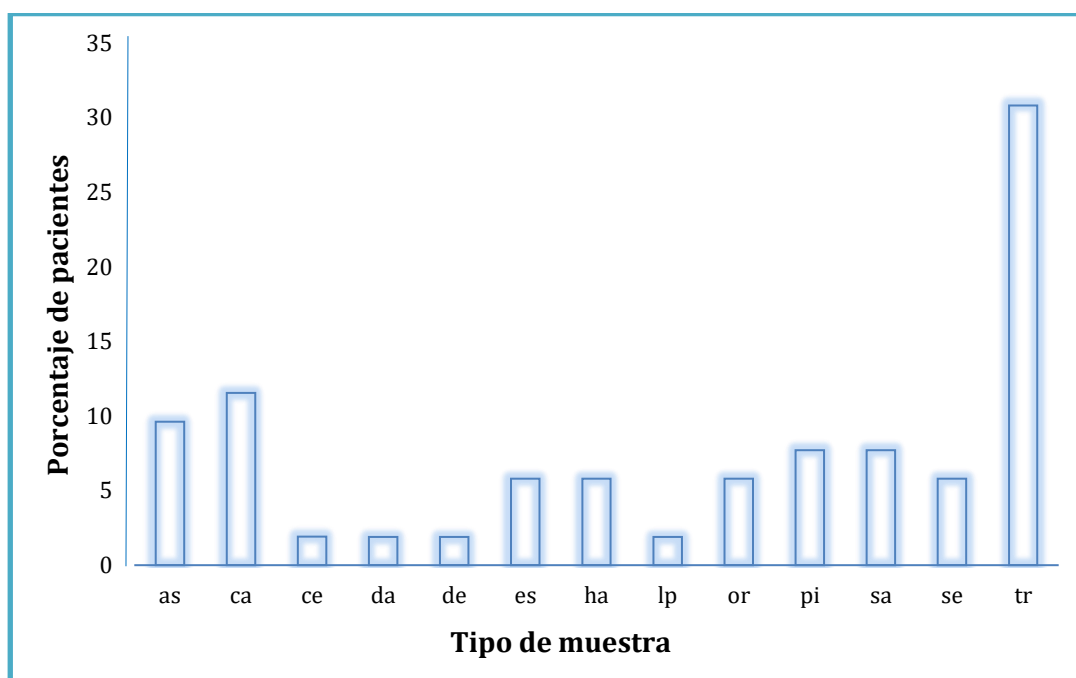


Figura 1. Tipo de muestras clínicas de los diferentes aislados de *Acinetobacter* spp. con respecto al total de pacientes. Acrónimos, as: absceso, ca: catéter, ce: líquido cefaloraquídeo, da: herida de cadera, de: muestra desconocida, es: esputo, ha: herida, lp: líquido pleural, or: orina, pi: piel, sa: sangre, se: secreciones y tr: secreción traqueal.

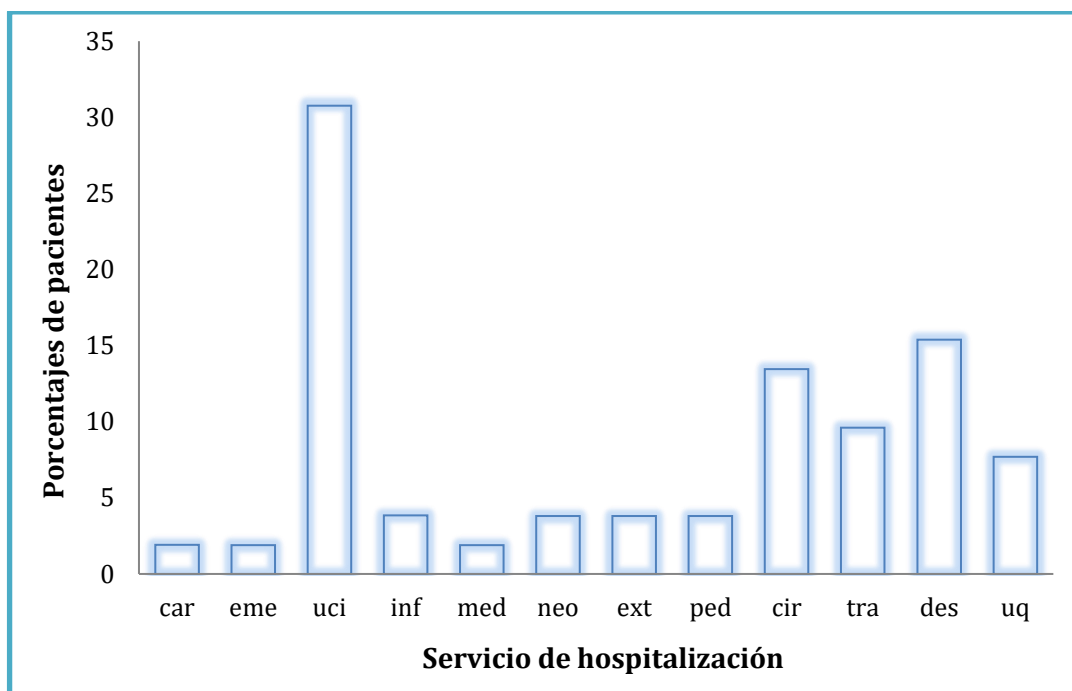


Figura 2. Servicio de muestras clínicas de los diferentes aislados de *Acinetobacter* spp. con respecto al total de pacientes. Acrónimos, car: cardiología, eme: emergencias, uci: unidad de cuidados intensivos, inf: infectología, med: medicina interna, neo: neonatología, ext: medicina externa, ped: pediatría, cir: cirugía, tra: traumatología, des: desconocido, uq: unidad de quemados.

Todos los aislados clínicos reactivados fueron viables, los mismos que fueron oxidasa y motilidad negativa, y catalasa positiva. A nivel macroscópico, las colonias presentaron bordes regulares, fueron mucoides, convexas, redondas y de color blanco en agar sangre (Figura 3a); mientras que, en agar MacConkey, las colonias fueron no fermentadoras (Figura 3b). A nivel microscópico, los aislados fueron bacilos Gram negativos (Figura 3c).

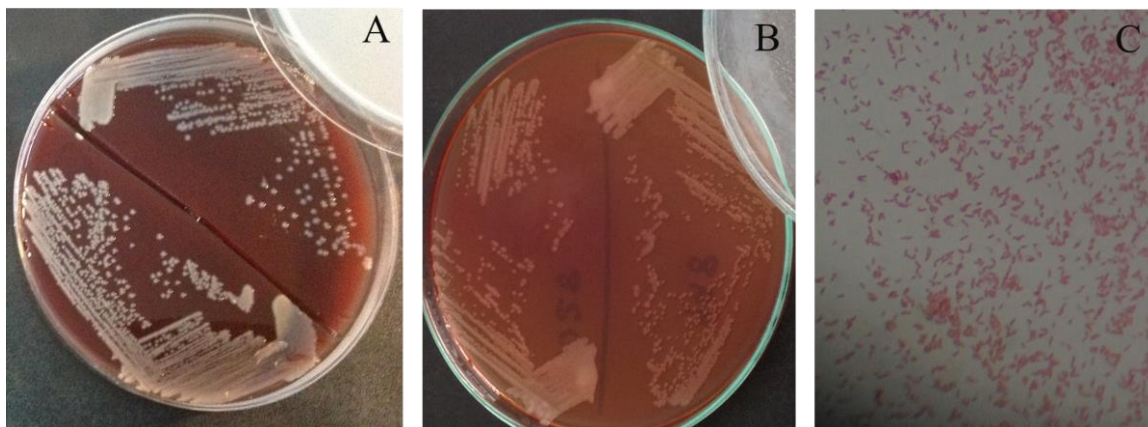


Figura 3. Caracterización morfológica de los aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. de cuatro hospitales de la ciudad de Quito. A) morfología de los aislados en agar sangre de cordero, B) morfología de los aislados en agar MacConkey y C) visualización microscópica de las células bacterianas a 100X.

4.1.2. Aislados ambientales

De los veintisiete sitios de colección, cuatro muestras (RMO3, RS5, RP4 y RG3) no mostraron crecimiento y en una muestra (RMO4) crecieron colonias no sospechosas para *Acinetobacter* spp. De veintidós puntos de colección, se obtuvo un total de veintiocho aislados que se caracterizaron por presentar una coloración roja en *CHROM AGAR* *Acinetobacter*, los mismos que corresponden a diferentes especies bacterianas (Figura 4; Tabla 1).

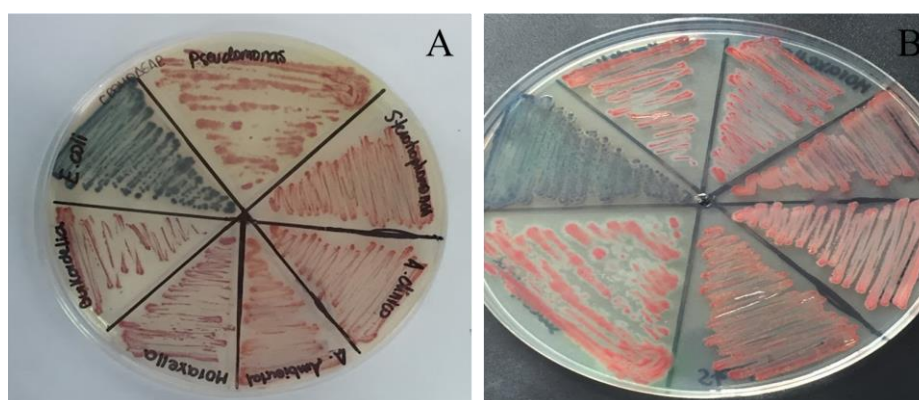


Figura 4. Crecimiento de diferentes bacterias en medio *CHROM AGAR* *Acinetobacter* spp. encontrados en cinco ríos de la ciudad de Quito. Las colonias azules constituyen enterobacterias; mientras que, las colonias rojas corresponden a bacterias no fermentadoras. A) vista superior del crecimiento de diferentes especies bacterianas y B) visualización interna del crecimiento bacteriano.

De los veintiocho aislados con pigmentación roja, diez fueron oxidasa y motilidad negativas, y catalasa positiva; mientras que, los otros aislados presentaron diferentes resultados en las pruebas bioquímicas antes mencionadas (Tabla 1). A nivel macroscópico, las diez colonias (35,7 %) sospechosas de *Acinetobacter* spp. presentaron bordes regulares, fueron mucoides, convexas, redondas y de color rojo en *CHROM AGAR Acinetobacter* (Figura 5a); mientras que, las otras colonias rojas tenían características morfológicas diferentes a las antes mencionadas. Además, las colonias fueron no fermentadoras en agar MacConkey (Figura 5b). A nivel microscópico, los diez aislados fueron bacilos Gram negativos (Figura 5c) y fueron identificados como *A. baumannii* (n = 6), el complejo *A. calcoaceticus/A. baumannii* (n = 3) y *A. haemolyticus* (n = 1). Mientras que, los dieciocho aislados restantes (64,3 %) fueron identificados como otras especies de diferentes géneros bacterianos (Tabla 1). Finalmente, los diez aislados identificados como *Acinetobacter* spp. fueron encontrados en cuatro ríos Monjas, Machángara, San Pedro y Pita.

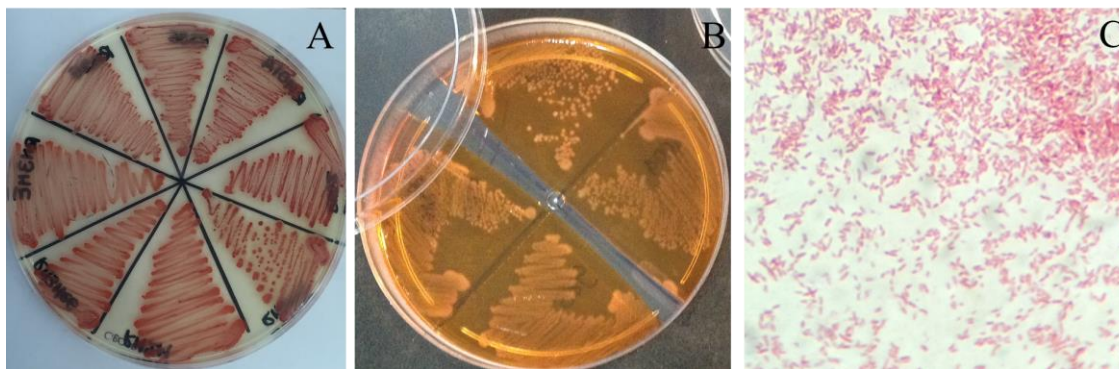


Figura 5. Caracterización morfológica de los aislados ambientales de *Acinetobacter* spp. provenientes de muestras de cuatro ríos de la ciudad de Quito. A) morfología de los aislados en *CHROM AGAR Acinetobacter*, B) morfología de los aislados en agar MacConkey y C) visualización microscópica de las células bacterianas a 100X.

Tabla 1. Aislamiento e identificación de los aislados ambientales provenientes de cinco ríos. En la tabla se indica el código de la muestra, número de colonias aisladas, los resultados de las pruebas bioquímicas y de la automatizada (*VITEK-2*) y el porcentaje de identidad (%). Acrónimos, RMO: río Monjas, RS: río San Pedro, RMA: río Machángara, RP: río Pita, RG: río Guayllabamba. (+): positivo, (-): negativo.

Código de la muestra	Número de colonias	Pruebas bioquímicas			Prueba automatizada <i>VITEK-2</i>	
		Oxidasa	Catalasa	Motilidad	Especie	Porcentaje (%)
RMO1	2	-	+	-	Complejo <i>A.calcoaceticus/A. baumannii</i>	99
		-	+	-	Complejo <i>A.calcoaceticus/A. baumannii</i>	99
RMO2	1	-	+	-	Complejo <i>A.calcoaceticus/A. baumannii</i>	98
RMO5	1	-	+	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
RMO6	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
RS1	1	+	+	+	<i>Burkholderia cepacia</i> group	99
RS2	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97
RS3	2	-	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
		-	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98
RS4	1	-	+	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
RS6	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No se realizó
RMA1	1	+	+	-	<i>Moraxella</i> group	91

Tabla 1. Continuación...

Código de la muestra	Número de colonias	Pruebas bioquímicas			Prueba automatizada VITEK-2	
		Oxidasa	Catalasa	Motilidad	Especie	Porcentaje (%)
RMA2	1	-	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
		-	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
RMA3	3	-	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98
		-	+	-	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	95
RMA4	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No se realizó
RMA5	1	-	+	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
RMA6	1	-	+	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
RP1	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
RP2	1	-	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
RP3	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
RP5	1	-	+	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
RP6	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No se realizó
RG1	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No se realizó
RG2	1	+	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No se realizó

4.2. Evaluación de susceptibilidad antibiótica

4.2.1. Aislados clínicos

Por lo general, los diferentes aislados no muestran sensibilidad a los antibióticos probados. Todos los aislados (100 %) fueron resistentes a tres antibióticos, meropenem, imipenem y piperacilina/tazobactam; mientras que, más del 80 % de los aislados presentaron resistencia a ocho antibióticos de elección. Por otro lado, solo el 48 % de los aislados fueron sensibles a un antibiótico, tobramicina (Figura 6, Anexo 7).

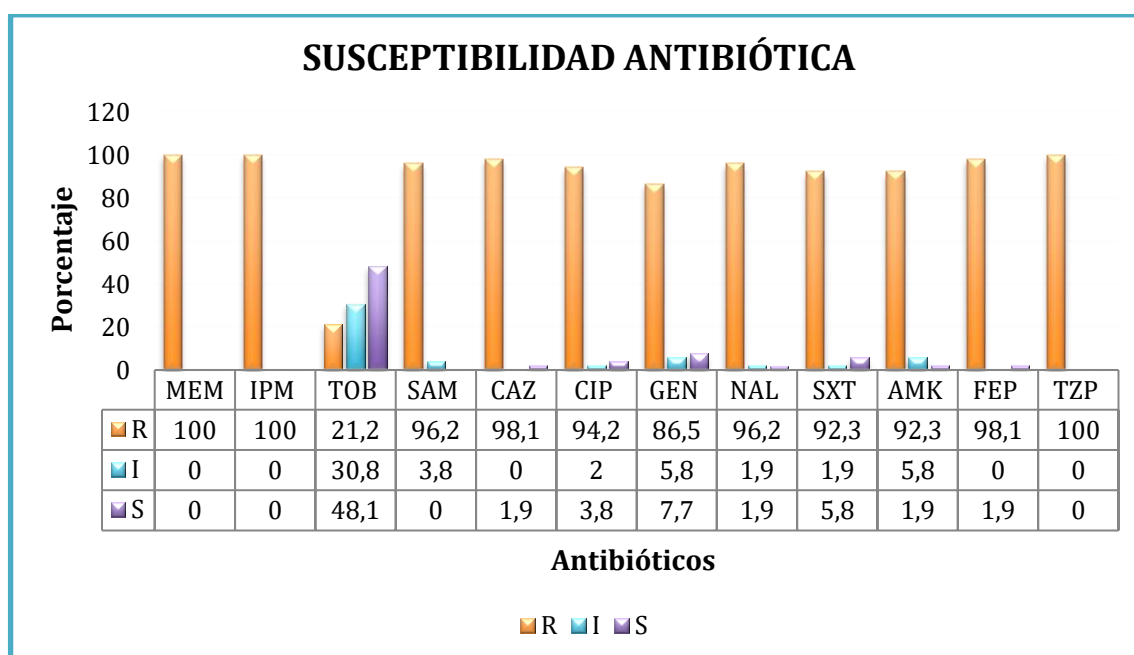


Figura 6. Perfil de resistencia de aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito. La figura indica los porcentajes de los aislados clínicos que fueron resistentes a cada antibiótico. Acrónimos, MEM: meropenem, IMP: imipenem, TOB: tobramicina, SAM: ampicilina/sulbactam, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidíxico, SXT: trimetropim/sulfametoxazol, AMK: amikacina, FEP: cefepime, TZP: piperacilina/tazobactam, R: resistente, I: intermedio, S: susceptible.

En cuanto a la sinergia con EDTA y ácido borónico fue negativa para todos los aislados clínicos, indicando que no hubo presencia de las enzimas serin- β -lactamasas ni de metalo- β -lactamasas (Figura 7).

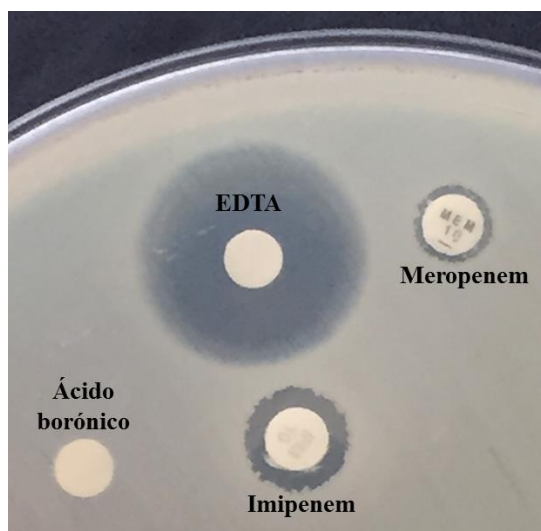


Figura 7. Sinergia con EDTA y ácido borónico de aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito. En la figura se observa que el ácido borónico no produce sinergia con el imipenem ni el EDTA con dos carbapenémicos, imipenem y meropenem.

4.2.2. Aislados ambientales

Todos los aislados (100 %) fueron sensibles a dos antibióticos, tobramicina y ampicilina/sulbactam. Por otro lado, nueve aislados (90 %) y cinco (50 %) fueron sensibles a gentamicina y trimetropim/sulfametoxazol, respectivamente. En cuanto a la resistencia, cinco aislados (50 %) fueron resistentes e intermedios a imipenem (Figura 8, Anexo 8). Por lo general, los diferentes aislados muestran un perfil que varía entre resistente e intermedio para ocho antibióticos (Figura 8). En cuanto a la sinergia con EDTA y ácido borónico fue negativa para todos los aislados, indicando que no hubo presencia de las enzimas serin- β -lactamasas ni de metalo- β -lactamasas (Figura 9).

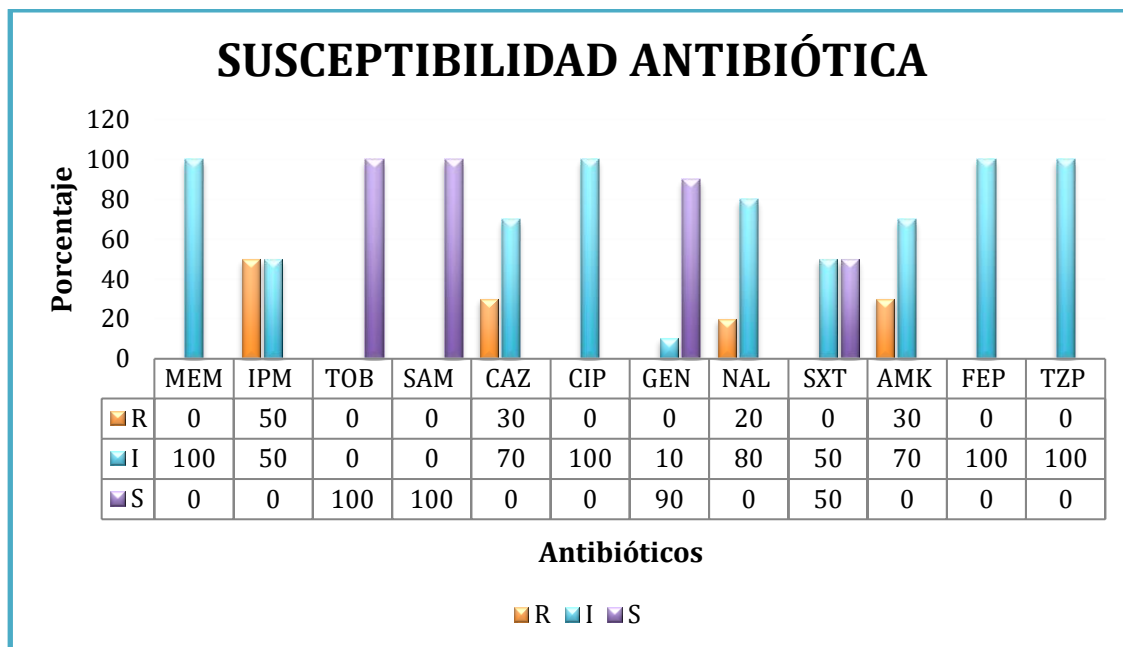


Figura 8. Porcentaje de susceptibilidad de aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito. La figura indica los porcentajes de resistencia, intermedio y sensible a cada antibiótico en aislados ambientales. Acrónimos, MEM: meropenem, IMP: imipenem, TOB: tobramicina, SAM: ampicilina/sulbactam, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidíxico, SXT: trimetropim/sulfametoxazol, AMK: amikacina, FEP: cefepime, TZP: piperacilina/tazobactam.

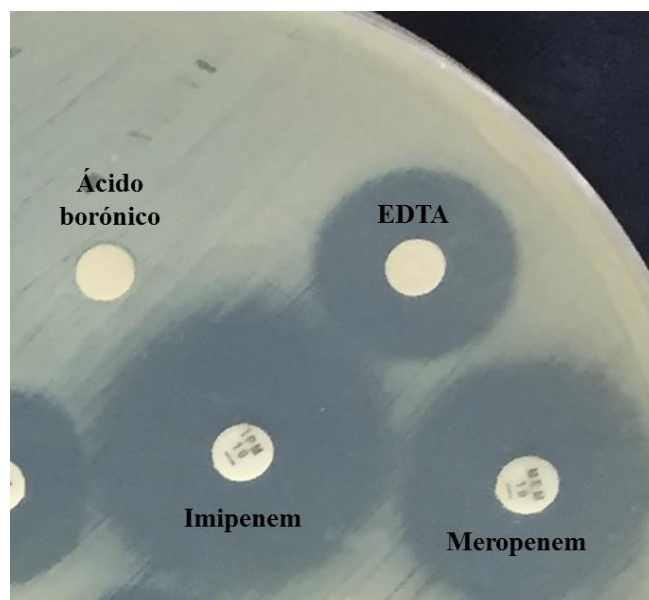


Figura 9. Sinergia con EDTA y ácido borónico de aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito. En la figura se observa que el ácido borónico no produce sinergia con el imipenem ni el EDTA con los dos carbapenémicos, imipenem y meropenem.

4.3. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN de los sesenta y dos aislados fue alta debido a que presentaron valores superiores a 50 ng/μl (Anexo 9 y 10). La concentración del aislado clínico 15-0853 fue relativamente baja con un valor negativo de -4,6 ng/μl (Anexo 9). El ADN obtenido presentó valores de A260/280 que varió entre 1,66 a 3,31 para los aislados clínicos (Anexo 9); mientras que, para los aislados ambientales los valores A260/A280 varió entre 1,86 a 2,14 (Anexo 10). En cuanto a los valores de A230/A260 variaron entre 0,31 a 2,98 para las muestras de ADN procedente de aislados clínicos (Anexo 9); mientras que, para las muestras de ADN de aislados ambientales los valores de contaminación osciló entre 0,58 a 1,1 (Anexo 10).

4.4. Amplificación de los genes de resistencia

4.4.1. Aislados clínicos

De los nueve genes, ocho amplificaron para los diferentes aislados clínicos. El gen *bla_{GIM}* no amplificó para ningún aislado (Figura 10). El producto de PCR de los genes varió de 200 pb que corresponde al gen *bla_{SIM}* hasta aproximadamente 700 pb para el gen *bla_{OXA-143}*. Los productos de los genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-58}* fueron de alrededor 450 pb, 350 pb y 650 pb, respectivamente; mientras que, el gen *bla_{OXA-24}* amplificó un producto de alrededor 250 pb. Finalmente, el gen *bla_{SPM}* y el gen *bla_{GES}* presentaron un producto de alrededor 400 pb y 650 pb, respectivamente. Los diferentes tamaños de los genes amplificados se pueden apreciar en la figura 11.

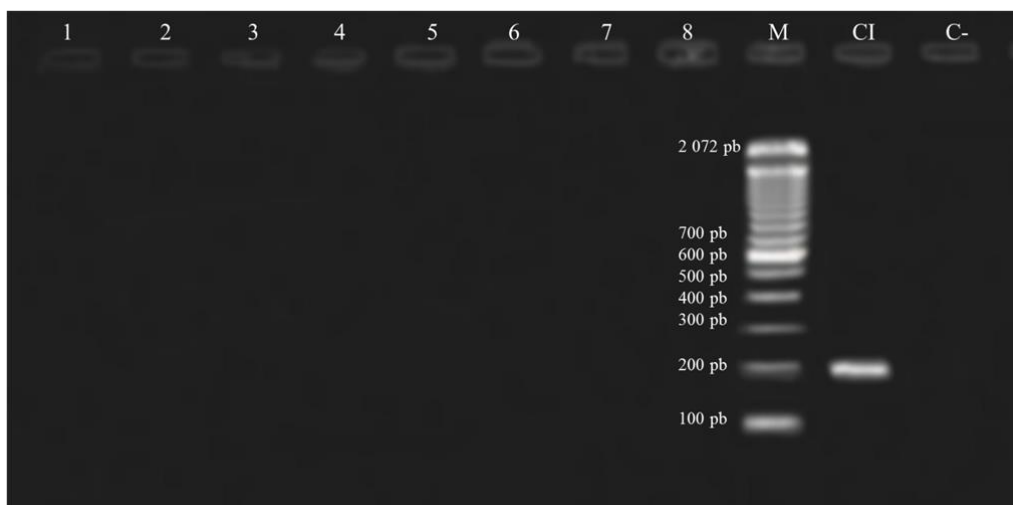


Figura 10. Representación de la amplificación del gen *bla_{GIM}* para los aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito. La figura representa la migración de la amplificación del gen *bla_{GIM}*. Las muestras en el gel son las siguientes 1: 15-0107, 2: 15-0122, 3: 15-0578, 4: 15-0610, 5: 1064, 6: 1175, 7:1367, 8: 1352, CI: control interno que corresponde al aislado 15-1175 que resultó positivo para el gen *bla_{SIM}*. C-: control negativo (agua de PCR), M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), pb: pares de bases.

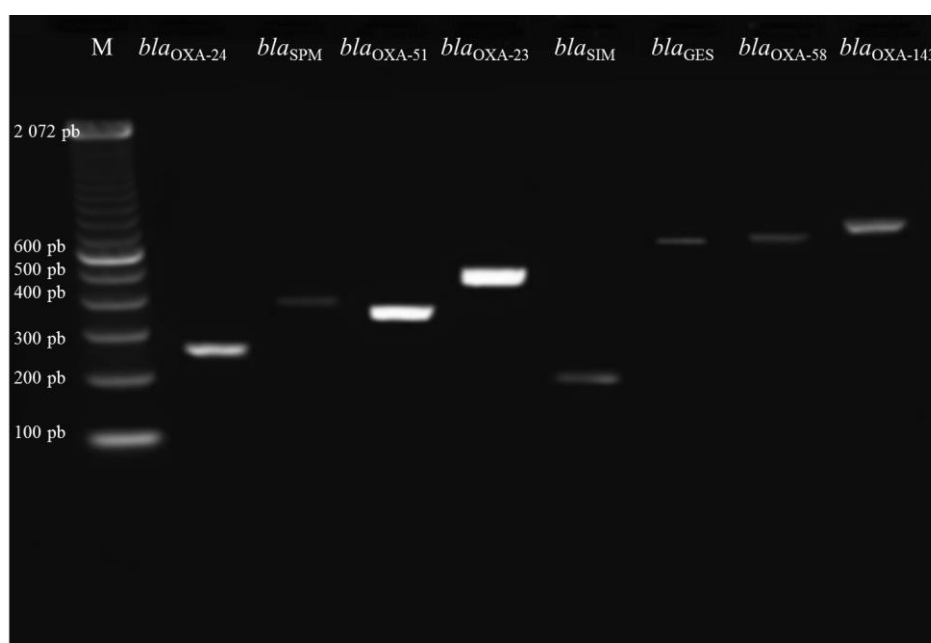


Figura 11. Representación del tamaño del producto de PCR de ocho genes amplificados de diferentes aislados clínicos. La figura indica los diferentes tamaños del producto de PCR que se encontraron en el presente estudio. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), pb: pares de bases. El tamaño de los productos de PCR de los genes *bla_{OXA-58}* y *bla_{SPM}* fueron del mismo tamaño tanto para aislados clínicos como para aislados ambientales.

Los aislados que fueron positivos para los diferentes genes amplificados se detalla en el Anexo 11. De todos los genes amplificados, los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51} se encontraron en un alto porcentaje (98 %) de los aislados clínicos; mientras que, los genes *bla*_{SIM} y *bla*_{OXA-143} presentaron un porcentaje del 1,9 % que representa a un aislado clínico (Anexo 11). El gen *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51} en conjunto representan el 57 % de los aislados, seguido de la co-resistencia de los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58} en un 36 %; mientras que, los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-51} se identificaron en un 6 %. Otras co-resistencias fueron detectadas en porcentajes bajos del 2 % y 4 % (Figura 12, Anexo 11).

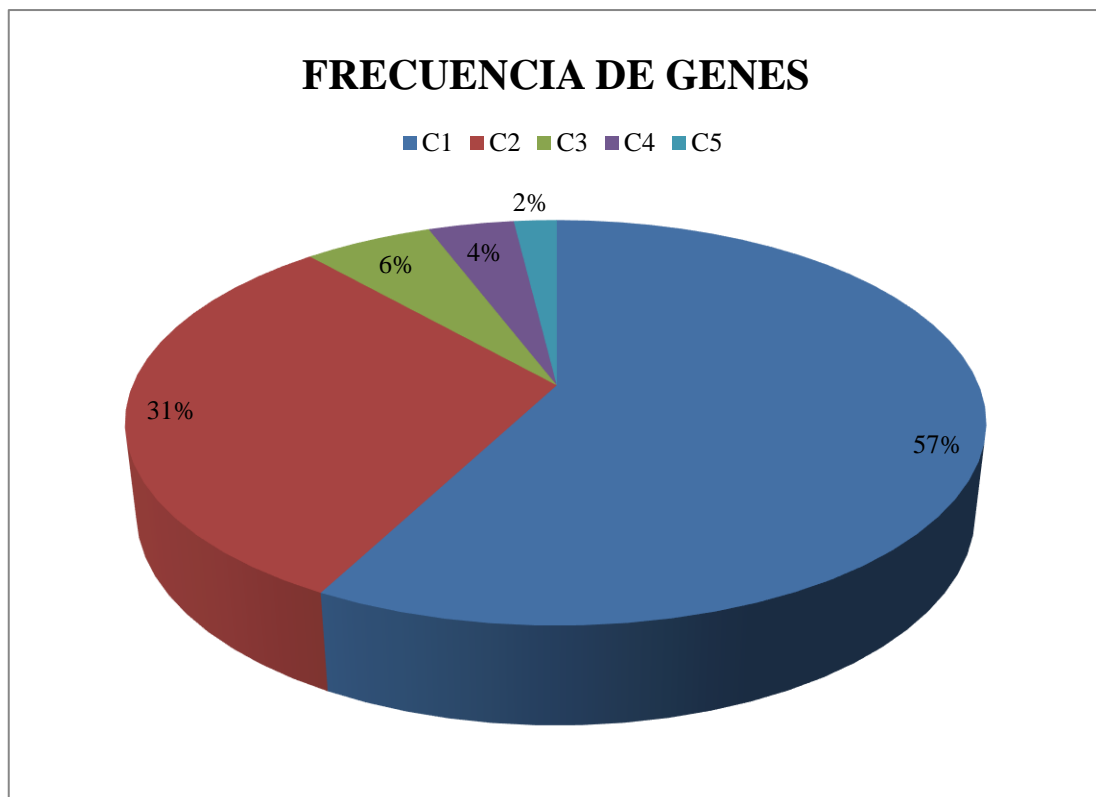


Figura 12. Porcentajes de los diferentes genes de resistencia encontrados en los aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito. C: co-resistencia, C1: *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51}; C2: *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58}; C3: *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-51}; C4: *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58}; C5: *bla*_{SIM}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-143}.

4.4.2. Aislados ambientales

De los nueve genes, tres, *bla_{SPM}*, *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-58}*, fueron positivos para diferentes aislados ambientales. Los aislados que fueron positivos para los diferentes genes amplificados se detallan en el Anexo 12. De los genes amplificados, el gen *bla_{OXA-51}* se presentó en todos los aislados (100 %), de las cuales siete muestras presentaron un producto de PCR cerca de 500 y tres amplificaron un producto de alrededor 1 200 pb (Figura 13). De las diez muestras, dos (20 %) fueron positivas para el gen *bla_{SPM}* con un producto de alrededor 400 pb, tres (30 %) para el gen *bla_{OXA-58}* con un producto de PCR cerca de 600 pb. El tamaño de los productos de PCR de los genes *bla_{SPM}* y *bla_{OXA-58}* se muestran en la figura 11. Los genes *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-58}* en conjunto se encontraron en un 43 %.



Figura 13. Tamaño del producto de PCR del gen *bla_{OXA-51}* de diez aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito. Los números del 1-10 representan las muestras. 1: RS3a, 2: RS3b, 3: RMA3b, 4: RMA3c, 5: RMA2, 6: RP2, 7: RMO1a, 8: RMO1b, 9: RMO2, 10: RMA3a. Acrónimos, C+: control positivo (*Acinetobacter baumannii* INH 628504), C-: control negativo (agua de PCR), M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), pb: pares de bases.

4.4.3. Análisis estadísticos

De acuerdo a la prueba de *Fisher* se estableció las diferencias entre los genes encontrados en los aislados clínicos y ambientales. El gen *bla*_{OXA-58} encontrado tanto en muestras ambientales como clínicas mostró diferencias significativas ($p < 0,05$). Por otro lado, los genes *bla*_{OXA-51} ($p = 0,839$) y *bla*_{SPM} ($p = 0,448$) no presentaron diferencias significativas entre los aislados clínicos y ambientales.

4.5. Análisis de las secuencias de los genes de resistencia

4.5.1. Identificación de los genes de resistencia de aislados clínicos

De los ocho genes que se enviaron a secuenciar se obtuvo resultado de seis para los aislados clínicos. Los genes de los cuales se obtuvieron secuencias fueron los siguientes *bla*_{OXA-51}, *bla*_{GES}, *bla*_{SPM}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-23}. Las secuencias de los genes *bla*_{SIM} y *bla*_{OXA-58} no se las editó ni limpió debido a que tenían mucho ruido de fondo.

Para las secuencias del gen *bla*_{OXA-51} se encontró tres haplotipos o variantes. El haplotipo uno se evidenció en diecisiete aislados 15-0117, 15-0122, 15-0181, 15-0499, 15-0500, 15-0577, 15-0580, 15-0589, 15-0590, 15-0590, 15-0610, 15-0795, 15-0853, 15-1064, 15-1138, 15-1367 y 15-1368. Por otro lado, el haplotipo dos se detectó en cuatro aislados 15-0578, 15-0581, 15-0582 y 15-1004; mientras que, el haplotipo tres se lo evidenció en dos aislados, 15-0107 y 15-1352. De acuerdo al porcentaje de similaridad, los haplotipos uno y dos se los identificó con la variante OXA-51 de la especie *Acinetobacter baumannii* (número de acceso *GenBank* LT594095.1) en un 99 y 100 %, respectivamente; mientras que, el haplotipo tres fue relacionado con la variante OXA-432 de *A. baumannii* en un 99 % (número de acceso *GenBank* NG049719.1) (Tabla 2).

En la secuencia nucleotídica se evidenciaron varios cambios en los haplotipos provenientes de aislados clínicos y ambientales que se aprecia en la figura 14A. Sin embargo, las mutaciones que se encuentran en las posiciones 314, 341, 343, 344 y 345 de los codones que codifican a los aminoácidos de las posiciones 105, 114 y 115 son propias de las secuencias reportadas en el presente estudio. En particular, todos los haplotipos (n = 5) encontrados en el presente estudio presentan el cambio en la posición 341 de adenina (A) por timina (T) que constituye la segunda posición del codón (AAG), que codifica para lisina (K) en la posición 114 en la secuencia de aminoácidos; por otro lado, en la secuencia se evidenció tres cambios en el codón (GCC) ubicado en las posiciones 343, 344 y 345 que codifica para alanina (A) en la posición 115 de la secuencia de aminoácidos (Figura 14B). Otra mutación característica se encuentra en la posición 314 donde cambia timina (T) por adenina (A) para codificar leucina (L) en la posición 105 de la secuencia aminoacídica y se presenta en tres haplotipos 1 3 y 4; mientras que, los haplotipos 1 y 2 no tienen la mutación mencionada y codifican para glutamina (Q) similar a las secuencias disponibles en el *Genbank*. Otras mutaciones que se presentan en el haplotipo 3 son las que se encuentran en las posiciones 46, 48, 52 y 171 (Figura 14A) de los codones que codifican asparagina (N) por aspártico (D), glutamina (Q) por lisina (K) y lisina (K) por asparagina (N), mientras que, en el haplotipo 5 presentó una mutación en la posición 52 que codifican glutamina (Q) por lisina (K) (Figura 14).

Para los genes *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-23} se reportó un haplotipo. El haplotipo del gen *bla*_{OXA-143} corresponde al aislado 15-1175 y fue relacionado con la secuencia de la variante OXA-499 de *A. pittii* en un 99 % (Figura 15A y B). En la secuencia nucleotídica hay un cambio en la posición 280 de guanina por (G) por adenina (A) que constituye la primera posición del codón (GTG) que codifica a una valina en la posición 94 de la secuencia

de aminoácidos (Figura 15C). El haplotipo del gen *bla_{OXA-24}* se identificó en seis aislados 15-0659, 15-0691, 15-0985, 15-1064, 15-1175 y 15-1367. Este haplotipo fue identificado como primera opción con la secuencia de la variante de OXA-72 presente en *A. baylyi* en un 100 % (Tabla 2). Finalmente, el gen *bla_{OXA-23}* fue detectado en veintitrés aislados que se detallan a continuación: 15-0107, 15-0117, 15-0122, 15-0181, 15-0499, 15-0500, 15-0577, 15-0578, 15-0580, 15-0581, 15-0582, 15-0589, 15-0590, 15-0590, 15-0610, 15-0795, 15-0853, 15-1004, 15-1064, 15-1138, 15-1352, 15-1367 y 15-1368. Estas secuencias presentaron una similaridad del 100 % con el gen *bla_{OXA-23}* presente en *A. baumannii* (Tabla 2).

Para el gen *bla_{GES}*, se editó y limpió dos secuencias de las seis secuencias que se envió a secuenciar, las otras secuencias (n = 4) no se pudo editar ni limpiar debido a la baja calidad de las mismas. Como resultado se identificó dos haplotipos del gen *bla_{GES}*, los mismos que fueron encontrados en los aislados 15-0691 (haplotipo 1) y 15-1175 (haplotipo 2). Para el gen *bla_{SPM}* se reportó un haplotipo procedente de siete aislados 15-0122, 15-0591, 15-0690, 15-0780, 15-0795, 15-0853 y 15-1138. Los genes *bla_{GES}* y *bla_{SPM}* fueron asociados con secuencias presentes en el cromosoma bacteriano diferente a los genes de resistencia, por lo que, no corresponden a ninguna de las variantes de los genes. Para las secuencias del gen *bla_{GES}* se las relacionó con secuencias del cromosoma de *Acinetobacter calcoaceticus* en un 98 y 99 %. La secuencia se encuentra en la posición 2 052 386 en el locus A0J50 que codifica un biopolímero de transporte. Para el gen *bla_{SPM}*, se lo asoció con secuencias de *A. baumannii* en un 99 %, la secuencia fue ubicada en la posición 22 450 en el locus Ay069 que codifica para una proteína hipotética en (Tabla 2).

4.5.2. Identificación de los genes de resistencia de aislados ambientales

Para las muestras ambientales, solo se obtuvo resultado de dos genes, *bla_{SPM}* y *bla_{OXA-51}*. Las secuencias del gen *bla_{OXA-58}* no se editaron y limpiaron debido a que tenían mucho ruido de fondo. Para el gen *bla_{OXA-51}* se identificó tres haplotipos nombrados después de los haplotipos clínicos como haplotipos 4, 5 y 6. El haplotipo cuatro está constituido por cuatro aislados ambientales, RP2, RMA3c, RSAa y RSAb; mientras que, el haplotipo cinco se encontró en tres aislados, RMA2, RMA3a y RMA3b. El haplotipo cuatro fue asociado con la secuencia que corresponde a la variante OXA-94; mientras que, el haplotipo cinco con la secuencia de la variante OXA-259 de *A. baumannii* en un 99 y 100 %, respectivamente (Tabla 2).

Finalmente, el haplotipo seis de las muestras ambientales se lo encontró en tres aislados, RMO1a, RMO1b y RMO2. De acuerdo al porcentaje de similaridad, el haplotipo seis del gen *bla_{OXA-51}* fue similar en un 75 % con la secuencia que corresponde a *Acinetobacter johnsonii* (número de acceso *GenBank* CP010350.1). Esta secuencia se la detectó en las posiciones 341 080 y 341 883 que abarca una región constituida por dos genes que codifican la transposasa (locus: RZ95-01645 y RZ95-01640).

Para el gen *bla_{SPM}*, se identificó un haplotipo que corresponde a los aislados RSAa y RMA3c diferente al reportado para los aislados clínicos del presente estudio. Sin embargo, las secuencias del gen *bla_{SPM}* no fueron identificadas con la variante SPM-1 presente en *Pseudomonas aeruginosa*. Esta secuencia fue relacionada con una región localizada en la posición 22 450 del cromosoma de *A. baumannii* en un 99 % (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de los genes de resistencia de aislados clínicos y ambientales. La tabla señala los genes, el número de haplotipos y de aislados, el tamaño y la identificación de las secuencias en *GenBank*. * corresponde haplotipos ambientales.

Genes	Número de haplotipos	Número de aislados	Tamaño (pb)	Identificación de secuencias		
				Código de acceso <i>GenBank</i>	Porcentaje de similitud (%)	Especie
<i>bla</i> _{OXA-143}	1	1	699	KT964029.1	99	<i>Acinetobacter pittii</i>
<i>bla</i> _{OXA-24}	1	6	208	FJ157355.1	100	<i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>bla</i> _{OXA-GES}	2	1	595	CP002177.1	99	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		1	600	CP002177.1	98	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>bla</i> _{SPM}	2	2*	243	CP015483.1	99	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		7	231	CP014540.1	98	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>bla</i> _{OXA-23}	1	23	471	LC100116.1	100	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		17	345	LT594095.1	99	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		4	345	LT594095.1	100	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>bla</i> _{OXA-51}	6	2	345	NG049719.1	99	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		4*	345	NG049835.1	99	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		3*	345	NG049554.1	100	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		3*	1063	CP010350.1	75	<i>Acinetobacter johnsonii</i>

4.6. Relaciones filogenéticas de cuatro genes de resistencia *bla*_{OXA}

El análisis de inferencia bayesiana para los genes *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-143} de *Acinetobacter* spp. generó un árbol bien definido y soportado, en particular en las agrupaciones principales, con valores de probabilidad posterior superior a 0,98 (Figura 16). Los haplotipos de los genes *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23} encontrados en el presente estudio y aquellos procedentes de la base de datos *GenBank* se agruparon como grupos hermanos dentro del clado 1 (Figura 16) y clado 2 (Figura 17). Los haplotipos 1, 2 y 4 del *bla*_{OXA-51}, se agrupan en el grupo ii del subclado A, con un valor de probabilidad posterior de 0,63. Por otro lado, los haplotipo 3 y 5 forman un grupo con un valor de probabilidad posterior de 0,56 dentro del grupo i del subclado A (Figura 16). El subclado B del clado 1 (Figura 16) o subclado B del clado 2 (Figura 17) está conformado principalmente por el gen *bla*_{OXA-23} en donde se incluye el haplotipo encontrado en el presente estudio y secuencias obtenidas del *GenBank*.

Por otro lado, los genes *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-143} se agruparon en el clado 2 con un valor de probabilidad posterior de 1 (Figura 16); mientras que, en la figura 17, los genes se agrupan como grupos hermanos dentro del clado 1 con un porcentaje de probabilidad posterior de 0,89. La variante OXA-72 encontrada en el presente estudio se agrupó con las variantes OXA-72 de *A. baylyi* y *A. baumannii* (código de acceso KP190117.1) y OXA-24 de las especies *Providencia rettgeri* y *Klebsiella pneumoniae* con un valor de probabilidad posterior de 1 (Figura 17). Por otro lado, la variante OXA-143 del presente estudio se relaciona con las variantes OXA-499 y OXA-255 de *A. pittii* con un valor de probabilidad posterior de 1 y 0,99 (Figura 16 y 17).

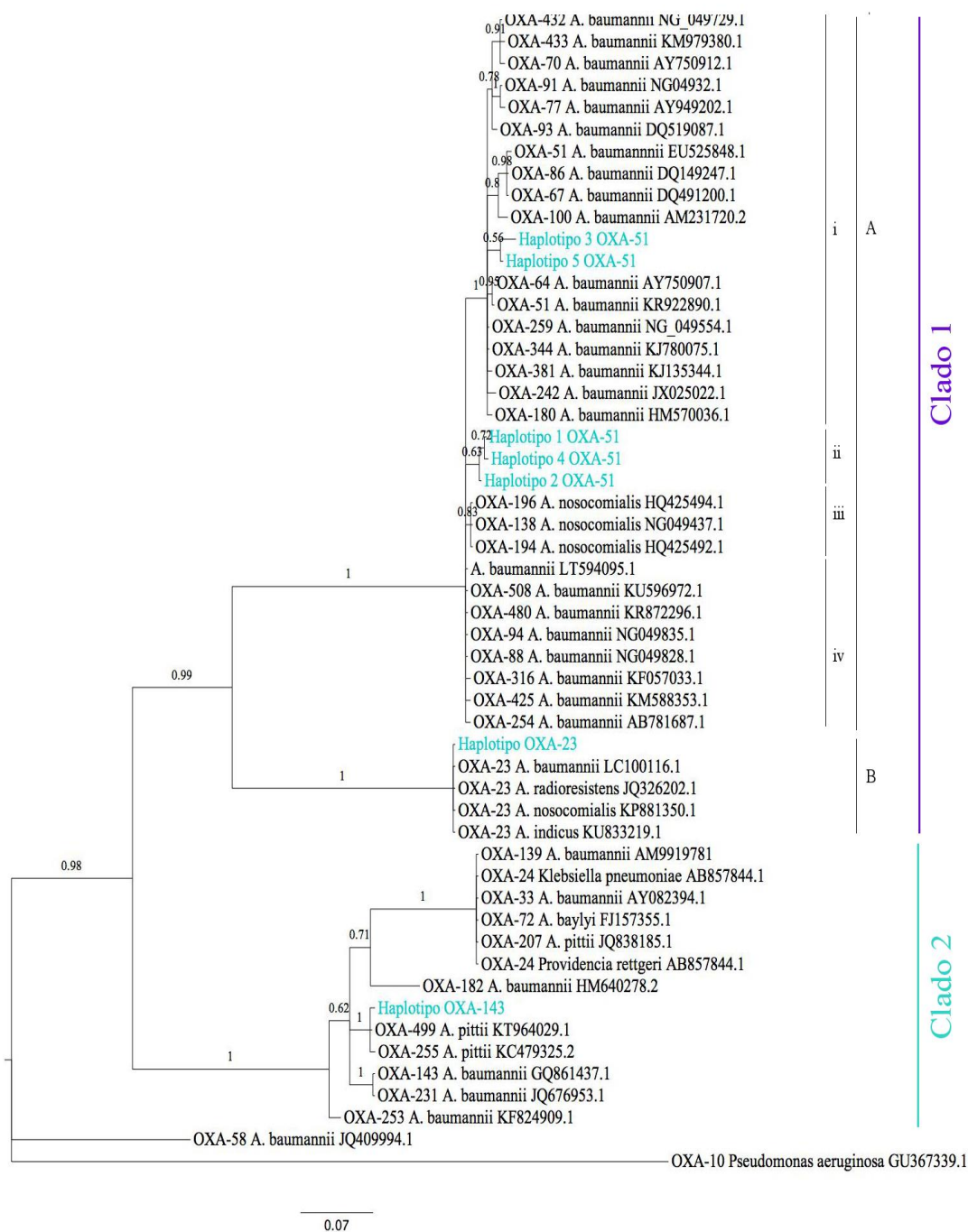


Figura 16. Relaciones filogenéticas con cuatro genes de la clase D de las serin- β -lactamasas de 333 pb. El filograma representa la inferencia de las relaciones con los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-143} en base al modelo evolutivo *Jukes-Cantor* (JC). Las secuencias obtenidas del *GenBank* se encuentran rotuladas con sus números de acceso. Los haplotipos encontrados en el presente estudio están de color turquesa. La longitud de las ramas representa el número de cambios o mutaciones. Los números que se encuentran sobre las ramas representan los valores de probabilidad posterior. Los grupos externos fueron las variantes OXA-58 de *Acinetobacter baumannii* (número de acceso *GenBank* JQ409994.1) y OXA-10 de *Pseudomonas aeruginosa* (número de acceso *GenBank* GU367339.1).

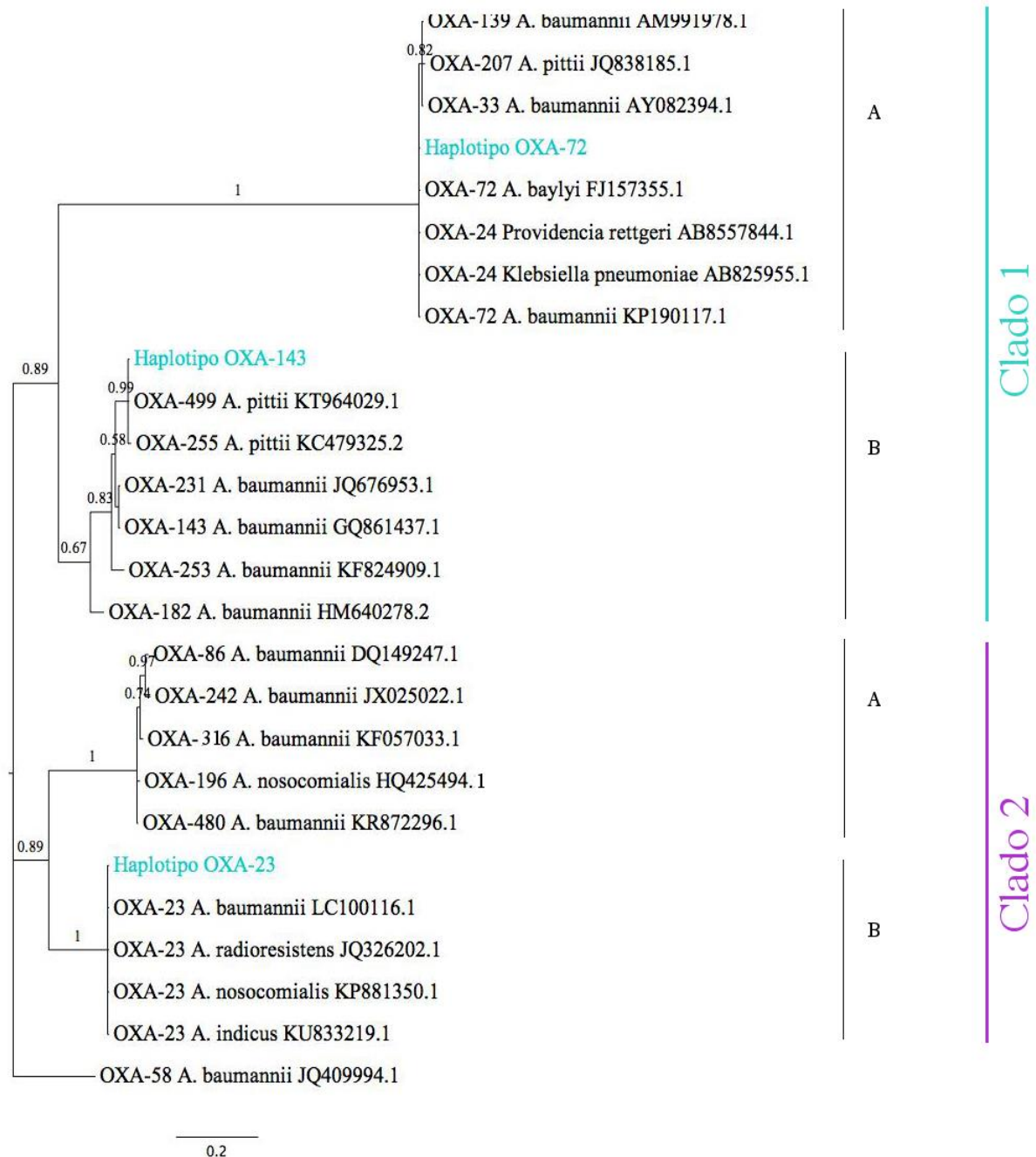


Figura 17. Relaciones filogenéticas de cuatros genes de la clase D de las serin-β-lactamasas de 205 pb. El filograma representa la inferencia de las relaciones de los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-143} en base al modelo evolutivo *Jukes-Cantor* (JC). Las secuencias obtenidas del *GenBank* se encuentran rotuladas con sus números de acceso. Los haplotipos encontrados en el presente estudio están de color turquesa. La longitud de las ramas representa el número de cambios o mutaciones. Los números que se encuentran sobre las ramas representan los valores de probabilidad posterior. El grupo externo fue la variante OXA-58 de *Acinetobacter baumannii* (número de acceso *GenBank* JQ409994.1).

5. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento e identificación de *Acinetobacter* spp.

5.1.1. *Acinetobacter* spp. en aislados clínicos

Las IAAS causadas por *Acinetobacter* spp. son asociadas principalmente con problemas de salud en los hospitales (Lee et al., 2011; Raka et al., 2013). Por lo general, *Acinetobacter* spp. han sido relacionadas con IAAS en la UCI (OMS, 2010); en particular, *A. baumannii* es la especie más encontrada en el área (Tsakiridou et al., 2014). En el presente estudio, los aislados de *Acinetobacter* spp. procedían primordialmente de la mencionada área en un 31 %. Similar a otros estudios, en donde mencionan que las especies del género han sido aisladas de la UCI en un 33,33 % (Royer et al., 2015) o 36,13 % (Yang, Liang, Gao, Wang, y Wang, 2015) aunque también se ha reportado su presencia en otras áreas como traumatología; en donde, el porcentaje fue alto (66,67 %) o en el área de cirugía con un porcentaje bajo (7,41 %) (Royer et al., 2015). Contrario al presente estudio, los aislados obtenidos de traumatología se encontraron en un porcentaje de 10 %; mientras que, los aislados procedentes de cirugía fue un poco más alto que el de traumatología (13 %). La presencia de *Acinetobacter* spp. en diferentes áreas de hospitalización se explica por su capacidad de sobrevivir en superficies inanimadas, aunque también puede estar presente en el personal sanitario (Brooks et al., 2014; Murray et al., 2014). En el presente estudio, los aislados se encontraron principalmente en la UCI; sin embargo, su identificación solo fue a nivel de género. Esto es porque la detección de *Acinetobacter* spp. es complicada a nivel fenotípico (Ajao et al., 2011). Por esta razón, no se puede inferir que los aislados clínicos correspondan a la especie *A. baumannii*, para su correcta detección a nivel de especie es necesaria una identificación molecular.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, la población más afectada por este tipo de infecciones fue la pediátrica (75 %). Esto se debe principalmente porque los aislados clínicos fueron en su mayoría procedentes de un centro de salud pediátrico de la ciudad. Esta población al estar expuesta a varios factores de riesgo es la más vulnerable. Entre los factores de riesgo se menciona el uso previo de antibióticos como carbapenémicos (Punpanich, Nithitamsakun, Treeratweeraphong, y Suntarattiwong, 2012), hospitalización y otras enfermedades asociadas, lo que genera mayor susceptibilidad para adquirir IAAS por diferentes especies de *Acinetobacter* (Hu y Robinson, 2010; Özdemir et al., 2011). Entre los microorganismos más aislados en la población pediátrica se ha reportado a *A. baumannii*, *A. lwoffii* y *A. calcoaceticus* (Hu y Robinson, 2010). Por otro lado, las infecciones causadas por esta bacteria se deben a la baja madurez inmunológica de los niños frente al sistema inmune de un adulto (Randolph y McCulloh, 2013). Razón por la cual, la población pediátrica es la más expuesta a contraer IAAS que la población adulta.

Las altas tasas de colonización de *Acinetobacter* spp. han sido reportadas en el tracto respiratorio de la UCI (Carvalho et al., 2013; Manchanda et al., 2010), las mismas que son responsables de altas tasas de mortalidad y morbilidad (Carvalho et al., 2013). En el presente estudio, los aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. fueron principalmente de secreciones traqueales (30,8 %), seguido de las muestras de catéter (12 %) y absceso (10 %). En el país, Alemán et al. (2011) reportan que solo el 17 % de *A. baumannii* estuvo presente en secreción bronquial; mientras que, Jiménez (2013) indica que la especie fue encontrada en aspirados traqueales en un 39 %. En otros países de Sudamérica como Brasil, la especie ha sido encontrada principalmente en secreciones traqueales en un porcentaje alto (56,3 %) (Carvalho et al., 2013); mientras que, en Colombia, Prado et al. (2014) también mencionan que el tracto respiratorio es el sitio más común de aislamiento de *A. baumannii* en un 53,6

% seguido de hemocultivo en un 17,8 %. En contraste, otros estudios mencionan que las infecciones causadas por *A. baumannii* fueron de infecciones del tracto urinario (21,2 %) o sangre (18,2 %); mientras que, las infecciones respiratorias fueron el 13,6 % (Anwar, Ejaz, Zafar, y Hamid, 2016). Por otra parte, las infecciones por *A. baumannii* son poco frecuentes en muestras procedentes de punta de catéter que puede ser del 3,5 %; mientras que, para muestras de absceso puede ser de un 7,1 % (Prado et al., 2014), porcentajes más bajos comparados con los del presente estudio. En contrate, Carvalho et al. (2013) mencionan que el segundo sitio de donde se aísla *A. baumannii* fue de la punta de catéter en un 16,9 %. Sin embargo, hay que tomar en consideración el tipo de catéter, así como de absceso para realizar una comparación. De acuerdo a los datos, *Acinetobacter* spp. puede ser uno de los principales responsables de IAAS a nivel de tracto respiratorio; sin embargo, los porcentajes varían de acuerdo a varios factores como el hospital, tipo de intervención, área de hospitalización, así como localización geográfica.

5.1.2. Aislamiento e identificación de *Acinetobacter* spp. de muestras ambientales

El aislamiento de *Acinetobacter* spp. es complicado por lo que se ha diseñado un medio selectivo *CHROM AGAR* para la detección de aislados que corresponden al mencionado género (Rambach, 2014). Sin embargo, el medio no resultó exclusivo para el crecimiento de *Acinetobacter* spp. y se determinó una baja especificidad debido al crecimiento de otras especies presentes en medios acuáticos. En el presente estudio crecieron especies bacterianas no fermentadoras de diferentes géneros como *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* que presentaban las mismas características que las colonias de *Acinetobacter* spp. Similares resultados han sido reportados en algunos estudios en donde mencionan que la especie *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. mostraron un crecimiento similar, volviéndolas indistinguibles (Ciftci, 2015; Moran-Gilad, Adler, Schwartz, Navon-Venezia, y Carmeli,

2014). Otra especie que no se la puede distinguir de *A. baumannii* es *S. maltophilia* (Ciftci, 2015). Aunque varios estudios indican que el medio ha demostrado ser sensible y específico para la detección de especies como *A. baumannii* (Barsoumian et al., 2013; Girlich y Nordmann, 2015), otros estudios mencionan que el medio *CHROM AGAR* no es específico para *Acinetobacter* spp. (Akers, Barsoumian, Beckius, Murray, y Mende, 2010; Moran-Gilad et al., 2014).

Adicionalmente, en el presente estudio no se usó el suplemento selectivo MDR para seleccionar poblaciones resistentes (Song et al., 2013); sin embargo, este suplemento no garantiza la selectividad de *Acinetobacter* spp. Esto es porque otras bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* también son multirresistentes (Ciftci, 2015). En particular, las especies del género *Stenotrophomonas* se caracterizan por ser patógenos oportunistas que se han adaptado a sobrevivir en condiciones extremas (Mahdi, Eklund, y Fisher, 2014). Por sus características, las especies del mencionado género pueden tolerar temperaturas bajas lo que le permite competir con el crecimiento de otras bacterias (Hayward, Fegan, Fegan, y Stirling, 2010; Mahdi et al., 2014). Particularmente, al momento de transportar las muestras al laboratorio se le dio las condiciones de refrigeración apta para que *Stenotrophomonas* spp. persistan más tiempo que *Acinetobacter* spp. Por esta razón, a esta bacteria se la aisló en conjunto con *Acinetobacter* spp. con colonias similares; por lo tanto, a nivel de colonia no se las pudo discriminar fácilmente.

Las especies de *Acinetobacter* se caracterizan por presentar una amplia distribución (Almasaudi, 2016; Raka et al., 2013). En el presente estudio, se aisló *Acinetobacter* spp. de ambientes acuáticos cercanos a viviendas, principalmente, de los ríos Monjas, Machángara, San Pedro y Pita. Estos ríos se caracterizan por ser los más contaminados de la ciudad, en

especial, los ríos Machángara y Monjas (Roldos, 2015; Yungán, 2010). Resultados similares fueron reportados por Hrenovic et al. (2016), Li et al. (2010) y Marinescu, Marutescu, Savin, y Lazar (2015) que aislaron *Acinetobacter* spp. en baja cantidad tanto de aguas de ríos como de aguas residuales. La presencia de *Acinetobacter* spp. estuvo acompañada de otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* y *Moraxella* en diferentes proporciones. En medios acuáticos se ha reportado la presencia de especies de los géneros *Pseudomonas* (Hrenovic et al., 2016; Li et al., 2010; Marinescu et al., 2015), *Bacillus* (Li et al., 2010), *Stenotrophomonas* (Hrenovic et al., 2016; Li et al., 2010; Nuñez, Tornello, Puentes, y Moretton, 2012), *Burkholderia* y *Aeromonas* (Marinescu et al., 2015).

La presencia de *Acinetobacter* spp., en particular de origen clínico, en ambientes acuáticos puede ser resultado de diversas actividades humanas. A pesar de que algunas especies del género *Acinetobacter* se las puede encontrar en ambientes naturales, no se las aisló en el río Guayllabamba. Esto puede ser principalmente a que las muestras del mencionado río no fueron colectadas cerca de los depósitos de aguas servidas. Similar a un estudio, en donde reportan una concentración más alta de *Acinetobacter* spp. en aguas servidas que en aguas de río lejos de los sitios de descarga; por lo que, los autores sugieren que la distribución de *Acinetobacter* spp. cambia en función de la corriente de agua (Zhang et al., 2009). Las especies de *Acinetobacter* se las encontró principalmente en aguas cercanas a viviendas; por lo tanto, lo más probable es que los aislados sean de origen clínico. En el río Guayllabamba es poco probable encontrar bacterias como *Acinetobacter* spp. de origen clínico debido a que están lejos de fuentes de aguas servidas o debido a que la carga bacteriana de origen clínico disminuye mientras más se aleja de la fuente de contaminación.

De acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere la presencia de *Acinetobacter baumannii*, *A. haemolyticus*, así como del complejo *A. calcoaceticus/A. baumannii* (Acb). La detección de *Acinetobacter* spp. es complicada con técnicas microbiológicas convencionales (Ajao et al., 2011) como se mencionó anteriormente. En particular, la identificación de las especies que conforman el complejo Acb no es posible en base a las características fenotípicas y la caracterización de pruebas automatizadas. Este complejo está conformado por especies de importancia clínica como *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* y *A. especie genómica 13TU (A. nosocomialis)* (Nemec et al., 2011). Para llegar a la determinación de las especies que conforma este complejo es necesario el uso de marcadores moleculares como el 16S rRNA, *rpoB* (Wang et al., 2014) y *gyrB* (Higgins, Lehmann, Wisplinghoff, y Seifert, 2010) que son los más importantes para la identificación de *Acinetobacter* spp.

En ambientes acuáticos como vertientes naturales o aguas residuales se ha documentado la presencia de diferentes especies de *Acinetobacter* (AL-Saffar et al., 2015; Raka et al., 2013). Estudios similares han encontrado varias especies de *Acinetobacter*, aunque otros estudios indican la presencia de una sola especie. Varios estudios reportan la presencia de solo una especie como *A. baumannii* aislado de aguas residuales (Ferreira et al., 2011; Hrenovic et al., 2016), *A. lwoffii* de aguas de zonas rurales (Poonia, Singh, y Tsering, 2014) y *A. junii* de aguas residuales municipales y de hospitales (Ferreira et al., 2011; Narciso-da-Rocha, Svensson-Stadler, Vaz-Moreira, y Manaia, 2013). En contraste, otros estudios documentan la presencia de algunas especies como *A. baylyi*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii* y *A. tandoii* en aguas residuales municipales (Narciso-da-Rocha et al., 2013). Por otro lado, en aguas de río se reportan especies como *A. baumannii* (Ali, Kumar, Shoket, y Kumar, 2014; Girlich et al., 2010), *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. guillouiae*, *A. haemolyticus* y

A. bouvetii (Xin et al., 2014). Por todo lo mencionado, hay una amplia variedad de especies del género, incluyendo a *A. baumannii*, que pueden estar presentes en diferentes tipos de ambientes acuáticos. En particular, en aguas riberneas cercanas a viviendas se puede encontrar especies de origen clínico como *A. baumannii* más que en aguas lejos de sitios de descargas de las aguas residuales.

De todas las especies del género, *Acinetobacter baumannii* se caracteriza por ser exclusivamente de ambientes hospitalarios (UCI), por lo que es raro encontrar esta especie en ambientes naturales (Antunes, Visca, y Towner, 2014; Evans et al., 2013; Hernández et al., 2010). Sin embargo, la especie ha sido reportada en las aguas del río Seine en París durante monitoreos de aislados bacterianos multirresistentes (Girlich et al., 2010). La posible presencia de la especie en los ríos muestreados de la ciudad puede deberse a diferentes factores como resultado de las actividades humanas. Los patógenos de origen clínico pueden llegar a ambientes acuáticos por medio de animales que los alberguen o de las aguas residuales (Moore et al., 2010) que se descargan directamente al río sin un tratamiento previo. En particular, las aguas residuales de los hospitales son consideradas las mayores fuentes de bacterias patógenas multirresistentes (Ferreira et al., 2011; Zhang et al., 2013), así como de residuos de antibióticos (Li et al., 2010; Marinescu et al., 2015), volviendo a los ambientes acuáticos en reservorios de patógenos multirresistentes (Ferreira et al., 2011; Marinescu et al., 2015; Nuñez et al., 2012). Por otro lado, también se ha propuesto que el medio acuático puede ser un reservorio natural alternativo de la especie *A. baumannii* (Antunes et al., 2014). La posible presencia de especies de *Acinetobacter* se debe principalmente a las diferentes actividades humanas.

La posible presencia de *Acinetobacter baumannii*, así como de otros patógenos en ambientes acuáticos es de gran preocupación. En particular, esta bacteria se caracteriza por

ser un patógeno oportunista de importancia clínica por su alta resistencia a los carbapenémicos, así como otros antibióticos de elección (Nodarse y Fuerte, 2015; Rafei et al., 2014; Rodríguez et al., 2010). Por otro lado, la especie puede sobrevivir por periodos largos en el medio ambiente (AL-Saffar et al., 2015; Kempf y Rolain, 2012). Además, las especies de *Acinetobacter* adquieren y diseminan genes de resistencia fácilmente, aunque se encuentren en bajas cantidades (Narciso-da-Rocha et al., 2013; Silva, Grosso, Sousa, y Peixe, 2016), diseminación que puede ser facilitada por el agua.

El medio acuático constituye un hábitat que permite la existencia de bacterias resistentes en donde se da la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes ya sea por plásmidos o transposones (Stokes y Gillings, 2011). Razón por la cual, se ha propuesto que en el medio ambiente se da la evolución y el surgimiento de nuevas resistencias en las bacterias (Lupo et al., 2012; Walsh et al., 2011). La exposición de antibióticos puede generar una presión selectiva a los mismos, con una consecuente diseminación de los genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes (Li et al., 2010; Moore et al., 2010). Igualmente, si en el medio está presente un gran número de bacterias resistentes puede transferir los genes presentes en elementos extracromosomales o móviles (Li et al., 2010; Marinescu et al., 2015). Bajo estas condiciones es posible acelerar la evolución de la resistencia, incrementando su abundancia, así como la distribución de los genes de resistencia (Finley et al., 2013). Por esta razón, las bacterias ambientales pueden servir como un reservorio de genes de resistencia y una fuente potencial de nuevas resistencias en patógenos de importancia clínica (Li et al., 2010).

El agua en condiciones favorables es un medio para la diseminación de determinantes genéticos de resistencia (Narciso-da-Rocha y Manaia, 2016; Zhang et al., 2009), así como la transmisión de patógenos como *Acinetobacter* spp. hacia los humanos (Silva et al., 2016).

La dispersión de la resistencia antibiótica puede darse entre especies del mismo género y especies de distintos géneros mediada por la transferencia horizontal de genes; como resultado, los patógenos con una alta resistencia a los carbapenémicos pueden llegar a ser un riesgo potencial a nivel de salud y ser responsables de futuros brotes. Por lo tanto, se remarca la importancia de monitorear la calidad de agua, así como de implementar medidas de control (Marinescu et al., 2015; Rafei et al., 2014) debido a que las aguas servidas con patógenos multirresistente pueden llegar a contaminar otras fuentes de agua e incluso pueden llegar a provocar brotes aislados.

5.2. Susceptibilidad antibiótica de *Acinetobacter* spp.

Las especies de *Acinetobacter* se caracterizan por ser multirresistentes, generando un problema de salud pública a nivel mundial (OMS, 2015; Rafei et al., 2014; Rodríguez et al., 2010). Las especies no solo son resistentes a los carbapenémicos sino también presentan una alta resistencia a otros antibióticos de elección (Nodarse y Fuerte, 2015; Rafei et al., 2014; Rodríguez et al., 2010). Aunque las especies de *Acinetobacter* se caracterizan por tener una alta resistencia a los carbapenémicos (Almasaudi, 2016; Manchanda et al., 2010), en el país, no se ha investigado ampliamente el estado actual de la resistencia a los mencionados antibióticos en las diferentes especies de *Acinetobacter*.

En el presente estudio, todos los aislados clínicos analizados fueron resistentes a los carbapenémicos imipenem y meropenem. Similar a otros estudios en donde han encontrado resistencia a los dos antibióticos con el mismo porcentaje o sobre el 90 % (Cicek et al., 2013; Dall et al., 2015; Hakemi et al., 2014). El porcentaje de resistencia fue más alto comparado con el estudio de Jiménez (2013) en donde mostró que *A. baumannii* fue resistente al imipenem y meropenem en un 89 y 87 %, respectivamente. Por otro lado, diferentes

investigaciones han documentado que *Acinetobacter* spp. presenta una resistencia más alta al meropenem que para el imipenem (Hart et al., 2010; Shrestha et al., 2016). En contraste, los aislados ambientales presentaron resistencia solo al imipenem; mientras que, para el meropenem todos los aislados fueron intermedios. A diferencia de estudios en donde encontraron que *Acinetobacter* spp. provenientes de aguas residuales fueron resistentes al meropenem e imipenem (Hrenovic et al., 2016; Nuñez et al., 2012).

La resistencia a los carbapenémicos en *Acinetobacter* spp. se debe principalmente a la adquisición de genes de resistencia, en especial, de los genes *bla_{OXA}* (Evans y Amyes, 2014; Kamolvit et al., 2014). En el presente estudio se identificó mediante secuenciamiento los genes *bla_{OXA}-23*, *bla_{OXA}-72*, *bla_{OXA}-51* y *bla_{OXA}-143*, los mismos que serían los responsables de la alta resistencia a los carbapenémicos encontrada en los aislados clínicos. Sin embargo, estos genes se caracterizan porque codifican enzimas que hidrolizan al imipenem, pero no siempre al meropenem (Shrestha et al., 2015), por lo que, no siempre se generará una resistencia al mencionado antibiótico (Evans y Amyes, 2014). La resistencia se incrementa con otros mecanismos como las bombas de eflujo en donde se ha documentado que generan resistencia al meropenem (Wong et al., 2009), por lo que, se explicaría la resistencia al mencionado antibiótico en los aislados clínicos. En el caso de los aislados ambientales, el gen *bla_{OXA}-51* sería el responsable de la resistencia al imipenem encontrada; sin embargo, este gen por si solo ejerce una resistencia débil (Gordon y Wareham, 2010). En los casos en donde las oxacilinasas no son las responsables de la resistencia a los carbapenémicos puede ser explicada por la resistencia intrínseca por parte de la bacteria como la modificación de proteínas de unión a las penicilinas (PBPs), alteración de las porinas (Shrestha et al., 2015) o de la bomba de eflujo. Aunque esta última solo confiere resistencia al meropenem y no al imipenem (Wong et al., 2009); sin embargo, se debe tomar en consideración que estos

aislados presentan resistencia intermedia al meropenem. Por lo que, en aislados ambientales estaría actuando, principalmente, resistencia intrínseca mediada posiblemente por la bomba de eflujo y el cambio de las porinas que se incrementa en presencia de un gen *bla_{OXA}*. En resumen, la resistencia observada para los aislados clínicos y ambientales puede estar mediada por la presencia de los genes *bla_{OXA}* en conjunto con la resistencia intrínseca de la bacteria.

Por otro lado, los aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. presentaron resistencia adicional a los β -lactámicos más inhibidores como piperacilina/tazobactam y ampicilina/sulbactam. Estudios similares reportan que las especies tienen un alto porcentaje de resistencia a estos β -lactámicos incluso más alta que a los carbapenémicos (Hart et al., 2010; Jiménez, 2013; Prado et al., 2014; Shrestha et al., 2016). En particular, *Acinetobacter* spp. presentan altos porcentajes de resistencia a piperacilina/tazobactam (Dall et al., 2015; Hart et al., 2010; Higgins et al., 2010; Jiménez, 2013; Nodarse y Fuerte, 2015) debido a que las especies del género han desarrollado resistencia por la producción de β -lactamasas plasmídicas (Navarro et al., 2011). Sin embargo, otro estudio menciona que la resistencia a piperacilina/tazobactam se debe a la presencia del elemento de inserción *IS1006* dentro del *ISAb_{a3}* (Chen, Chang et al., 2010). Por otro lado, la resistencia ampicilina/sulbactam puede ser mediada por el gen adquirido *bla_{OXA-72}* (Kuo et al., 2013) o por la presencia del elemento de inserción *ISAb_{a1}* que conduce la sobreexpresión del gen *bla_{ADC-7}* (Adams et al., 2010), en el caso de que los aislados presenten este gen de resistencia. En contraste, los aislados ambientales fueron sensibles a ampicilina/sulbactam, probablemente, los genes antes mencionados no se encuentran en aislados ambientales como es el caso del gen *bla_{OXA-72}* que no se lo detectó. La ausencia del gen *bla_{OXA-72}* puede ser uno de los motivos por el cual estos aislados fueron sensibles para el mencionado antibiótico.

Adicionalmente, los aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. presentaron resistencia a los aminoglucósidos, en particular a la gentamicina (86 %) y amikacina (92 %). Algunos estudios mencionan la resistencia de *Acinetobacter* spp. a amikacina (Aliakbarzade, Farajnia, Nik, Zarei, y Tanomand, 2014; AL- Saffar et al., 2015; Dall et al., 2015; Poonia et al., 2014; Yang et al., 2015) y gentamicina (Aliakbarzade et al., 2014; Dall et al., 2015; Hakemi et al., 2014; Hart et al., 2010). En contraste, los aislados ambientales fueron intermedios para amikacina (70 %) y sensibles para gentamicina (90 %). Adicionalmente, en aislados clínicos, la sensibilidad antibiótica con respecto a los antibióticos de elección se observó solo en tobramicina (48 %), similar a los aislados ambientales que fueron sensibles al mencionado antibiótico. En contraste, algunos estudios mencionan que *A. baumannii* presenta resistencia a la tobramicina en un 63 % (Aliakbarzade et al., 2014) o sobre el 90 % (Yang et al., 2015). Por otra parte, otros estudios reportan que los aislados ambientales fueron sensibles a aminoglucósidos como gentamicina y tobramicina como lo reporta Girlich et al. (2010). *Acinetobacter* spp. procedentes de aislados ambientales pueden ser sensibles a amikacina (Girlich et al., 2010); en contraste, en el presente estudio tanto aislados clínicos y ambientales fueron resistentes o intermedios, respectivamente. Por otro lado, otros estudios mencionan que *Acinetobacter* spp. son resistentes a antibióticos como gentamicina (Hrenovic et al., 2016; Poonia et al., 2014) y tobramicina (Hrenovic et al., 2016) de aislados provenientes de diferentes aguas residuales. La resistencia encontrada puede deberse a distintos mecanismos, intrínsecos o adquiridos, que se presentan en la bacteria (Aliakbarzade et al., 2014; Lee et al., 2012). Entre los mecanismos intrínsecos que pueden estar generando resistencia se menciona a las enzimas como acetil transferasas, fosfotransferasas o adenil transferasas (Gallo y Puglia, 2013). En especial, las ciclin transferasas, codificadas por el gen *AADB*, confieren resistencia tanto a la gentamicina como a la tobramicina (Aliakbarzade et al., 2014). Por otro lado, la resistencia a la amikacina puede ser mediada por la

inactivación del antibiótico generado por la enzima amoniglucósido-3'-fosfotransferasa VI (Gallo y Puglia, 2013) o por los genes *aphA6* (Adams et al., 2010) o *bla_{OXA-58}* (Fu et al., 2014).

Finalmente, los aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. presentaron resistencia a las cefalosporinas, fluoroquinolonas, trimetropim y sulfonamida. En particular, los aislados clínicos fueron resistentes a ceftazidima (98 %), ciprofloxacina (94 %), cefepime (98 %), ácido nalidíxico (96 %) y trimetropim/sulfametoxazol (92 %). En contraste, los aislados ambientales fueron intermedios para los antibióticos antes mencionados. Algunos estudios mencionan la resistencia de *Acinetobacter* spp. a ceftazidima (Aliakbarzade et al., 2014; Hakemi et al., 2014; Hart et al., 2010; Jiménez, 2013; Poonia et al., 2014). Mientras que, otros estudios reportan la resistencia mayor al 90 % a la ciprofloxacina y al cefepime (Dall et al., 2015; Hakemi et al., 2014; Hart et al., 2010; Jiménez, 2013). La resistencia a los diferentes antibióticos puede ser mediada por mutaciones heredadas que han sido seleccionadas (Khorsi et al., 2015) o incluso adquiridas. En particular, la resistencia a las quinolonas esta mediada por mutaciones en varios genes como *gyrA*, *gyrB*, *ParC* y *ParE*, siendo la mutación en *gyrA* el mecanismo más importante relacionado con la resistencia a las quinolonas (Álvarez-Hernández, Garza-Mayén, y Vázquez-López, 2015). Sin embargo, la mutación generada en el gen *gyrA* por sí sola no es efectiva para generar resistencia a la ciprofloxacina. La resistencia al mencionado antibiótico se incrementa con la mutación en conjunto con el gen *ParC* (Ardebili et al., 2015). Por otro lado, la resistencia a las cefalosporinas se ve mediada por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) cuando existe una sobre expresión cromosómica de cefalosporinasas (Navarro et al., 2011). Finalmente, la resistencia al antibiótico trimetoprim/sulfametoxazol es mediada por dos genes de resistencia *dhfr* y *sul* que confieren resistencia a trimetoprim y a la sulfonamida,

respectivamente (Khorsi et al., 2015). Los dos genes se encuentran en la región 3' de un integrón clase 1 (Vanegas-Múnera et al., 2014).

Los aislados ambientales y clínicos presentaron diferentes patrones de susceptibilidad. Por lo general, las bacterias ambientales son más sensibles comparadas con bacterias de origen clínico. La diferencia en la resistencia encontrada entre los aislados clínicos y ambientales puede ser resultado de diferentes factores; como, por ejemplo, las condiciones biológicas, factores de virulencia, epidemiología o lugar de origen (Karmostaj, Najar, y Hatef, 2013). Sin embargo, el principal motivo de las diferencias en el patrón de susceptibilidad antibiótica encontrada entre aislados clínicos y ambientales puede estar relacionado con la concentración del antibiótico en cada ambiente. Por lo general, en el medio acuático se espera que la concentración sea menor que aquella que se encuentra en ambientes clínicos en donde se suministra antibióticos continuamente (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2013). Por lo general, los aislados clínicos se encuentran bajo una presión selectiva debido a que éstos están expuestos constantemente a la presencia de antibióticos, en particular, de amplio espectro. Bajo esta situación, la transmisión de determinantes genéticos entre los aislados clínicos se puede dar mediante transferencia horizontal de genes (Zhang et al., 2009; Manchanda et al., 2010), promoviendo el incremento de la resistencia antibiótica. Esta situación genera una evolución a la resistencia más rápida en los aislados clínicos que en aislados ambientales (Zhang et al., 2013). Por esta razón, los aislados ambientales aún son sensibles a determinados antibióticos, posiblemente porque estos aislados no están expuestos a todos los antibióticos a diferencia de los aislados clínicos. Sin embargo, hay que tener mucho cuidado con la interpretación de los resultados provenientes de muestras ambientales; primero, por el número de muestras y segundo porque para las muestras ambientales la caracterización de susceptibilidad antibiótica se tomó en cuenta los

puntos de corte que rigen a cepas clínicas de los estándares clínicos CLSI (2015), esto fue debido a la falta de parámetros específicos para bacterias ambientales de acuerdo a esta institución. Finalmente, la sensibilidad antibiótica es un parámetro importante para establecer un tratamiento eficiente contra infecciones causadas por *Acinetobacter* spp.

5.3. Genes de resistencia de las serin- β -lactamasas de *Acinetobacter* spp. procedentes de aislados clínicos

A nivel mundial, la acumulación de mecanismos de resistencia a los carbapenémicos tanto intrínsecos como adquiridos constituyen factores para la alta tasa de la resistencia a los carbapenémicos en *Acinetobacter* spp. El mecanismo de resistencia de las bacterias es mediante la degradación enzimática llevada a cabo por las carbapenemasas (Hammoudi et al., 2015). En particular, *Acinetobacter* spp. se caracterizan por su mecanismo de resistencia que es la presencia de las enzimas serin- β -lactamasas, especialmente, las del tipo oxacilinasas (Evans y Amyes, 2014; Nowak, Paluchowska, y Budak, 2012; Périchon et al., 2014). En el presente estudio, se encontró principalmente los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51} en alto porcentaje en la mayoría de los aislados clínicos. En contraste, en los aislados ambientales que se identificó solo el gen *bla*_{OXA-51}. En aislados clínicos, otros genes que fueron identificados y caracterizados en menor porcentaje fueron *bla*_{OXA-72} (11,5 %) y *bla*_{OXA-143} (1,9 %). Todos estos genes son los responsables de la alta resistencia que presentan *Acinetobacter* spp., los mismos que se encuentran circulando principalmente en ambientes hospitalarios.

5.3.1. Gen de resistencia *bla*_{OXA-23} presente en *Acinetobacter* spp.

El alto porcentaje del gen *bla*_{OXA-23} encontrado en el presente estudio está relacionado con su distribución a nivel mundial, la misma que ha sido asociada a una diseminación clonal

(Higgins et al., 2010; Mugnier et al., 2010). A nivel de Sudamérica, el gen ha sido reportado en varios países como Brasil, Colombia, Argentina (Opazo, Domínguez et al., 2012) y Venezuela (Cuaical et al., 2012). La diseminación del gen en la región se debe principalmente a nuevos clones de *A. baumannii*, así como cepas no clonales (Labarca et al., 2016). En el Ecuador, este es el primer reporte de la presencia de la enzima OXA-23 en aislados clínicos de *Acinetobacter* spp.

La presencia de este gen está relacionada con la alta resistencia encontrada a los carbapenémicos como imipenem y meropenem. Similar a varios estudios, en donde reportan que el gen *bla*_{OXA-23} es el principal responsable de la alta resistencia a los mencionados carbapenémicos (Adams et al., 2010; Ji et al., 2014; Wu et al., 2015). Por otro lado, otros estudios indican que el gen *bla*_{OXA-23} en conjunto con el gen *bla*_{OXA-51} son los principales responsables de la resistencia a los dos carbapenémicos (Cuaical et al., 2012; Dall et al., 2015; Evans et al., 2013; Perilli et al., 2015). En contraste, otros estudios han encontrado que el gen *bla*_{OXA-23} es responsable de la resistencia solo al imipenem (Fonseca et al., 2013; Hammoudi et al., 2015; Khorsi et al., 2015; Mostachio et al., 2012; Routray et al., 2013; Royer et al., 2015). En *Acinetobacter* spp., la resistencia generada por el gen *bla*_{OXA-23} es mediada por la transferencia de plásmidos que contienen las secuencias de inserción *ISAbal* (Khorsi et al., 2015; Martínez y Mattar, 2012; Opazo, Sonnevend et al., 2012; Teixeira et al., 2013) o por el gen intrínseco en donde el elemento de inserción *ISAcraI* promueve su sobreexpresión (Higgins, Zander, y Seifert, 2013). La presencia de estos elementos de inserción no solo fomenta la resistencia del gen *bla*_{OXA-23} sino que también genera la expresión del gen *bla*_{OXA-51}, aumentando la resistencia de la bacteria a los carbapenémicos, imipenem y meropenem (Jung y Park, 2015). Además, el gen *bla*_{OXA-23} ha sido reportado en transposones como el Tn2009 (Li et al., 2015). Si el gen *bla*_{OXA-23} se encuentra en plásmidos

puede diseminarse en una alta tasa mediante transferencia horizontal de genes; por lo que, su diseminación en otras provincias del país, así como en el medio ambiente es muy probable. Aunque por el momento no se encontró el *bla*_{OXA-23} en los sitios muestreados de los diferentes ríos, no se descarta su presencia en el medio ambiente.

5.3.2. Gen de resistencia *bla*_{OXA-51} presente en *Acinetobacter* spp.

El alto porcentaje del gen *bla*_{OXA-51} encontrado en el presente estudio está relacionado con su distribución a nivel mundial (Higgins et al., 2010). En Sudamérica, el gen ha sido reportado en aislados clínicos en varios países (Opazo, Domínguez et al., 2012), especialmente en Venezuela (Cuaical et al., 2012), Bolivia (Fernández et al., 2009), Brasil (Figueiredo, Netto et al., 2011; Fonseca et al., 2013) y Colombia (Martínez y Mattar, 2012). En el Ecuador, este es el primer reporte de la presencia de la enzima OXA-51 en aislados clínicos de *Acinetobacter* spp.

La presencia del gen sugiere que *Acinetobacter baumannii* sería la especie más frecuente en ambientes clínicos. Esto es porque el gen se lo considera como marcador intrínseco para la mencionada especie (Higgins et al., 2010; Périchon et al., 2014), el mismo que se encuentra en al menos tres transposones (Li et al., 2015) dentro del cromosoma (Figueiredo, Netto et al., 2011; Poirel et al., 2010; Lee et al., 2009). Sin embargo, varios estudios mencionan que el gen puede estar presente también en plásmidos junto a elementos de inserción como *ISAbal* (Chen, Cuaical et al., 2012; Lee et al., 2012; Martínez y Mattar, 2012) e *ISAbal825* (Lopes, Al-Hassan, y Amyes, 2012). El gen al estar presente en plásmidos permite su fácil diseminación entre las especies del género; por lo que, este gen también se lo ha encontrado en otras especies como *A. pittii*, *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii* (Perichón et al., 2014) y *A. nosocomialis* (Lee et al., 2012). Por esta razón, los tres haplotipos encontrados

en aislados clínicos pueden estar presente tanto en *A. baumannii* como en especies no *baumannii*. Por lo tanto, no se puede afirmar que los aislados correspondan a la especie *A. baumannii*.

El gen *bla*_{OXA-51} por sí solo no confiere una fuerte resistencia a los carbapenémicos (Gordon y Wareham, 2010); sin embargo, en conjunto con los elementos de inserción como *ISAbal* o *ISAbal825* promueven la resistencia a los mencionados antibióticos (Evans et al., 2013; Jung y Park, 2015; Sen y Joshi, 2015). Esto explicaría la alta resistencia a carbapenémicos como imipenem y meropenem encontrada en el presente estudio. Como lo reportan diferentes estudios en donde la presencia de este gen estaría relacionada con la alta resistencia al imipenem (Chen, Lee et al., 2010; Evans et al., 2013; Martínez y Mattar, 2012) y meropenem (Chen, Lee et al., 2010). Adicionalmente, la resistencia se incrementa cuando otra enzima OXA está presente; en particular, el *bla*_{OXA-51} se lo detectó en conjunto con el gen *bla*_{OXA-23}, así como también con los genes *bla*_{OXA-58} y *bla*_{OXA-724}. Similar a otros estudios en donde reportan la presencia de los genes *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23} coexistiendo y mediando la resistencia a los carbapenémicos (Hart et al., 2010; Martinez y Mattar, 2012; Teixeira et al., 2013; Yang et al., 2015).

5.3.3. Gen de resistencia *bla*_{OXA-143} presente en *Acinetobacter* spp.

A nivel de Sudamérica, el gen *bla*_{OXA-143} fue reportado por primera vez en aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii* en Brasil (Higgins et al., 2009). Por lo que, su presencia en otros países sudamericanos se mencionaba que podría ser probable (Opazo Domínguez et al., 2012). Actualmente, algunas variantes del gen han sido documentadas, entre las que se menciona a OXA-231 y OXA-253 presentes en *A. baumannii* en Brasil (Gionco et al., 2012; Girlich et al., 2014). En el Ecuador, este es el primer reporte de la presencia de la

enzima OXA-143 presente en el aislado clínico 15-1175 de *Acinetobacter* spp. Este gen como se mencionó anteriormente estaría promoviendo la alta resistencia a los carbapenémicos encontrada en el estudio. La presencia del gen ha sido asociada con la alta resistencia a los carbapenémicos, en particular al meropenem, en conjunto con un mecanismo interno como la alteración de las OMPs (Mostachio et al., 2012). Por lo que, la resistencia al meropenem que presenta este aislado clínico puede estar relacionada con la presencia del gen *bla*_{OXA-143} en conjunto con la alteración de las OMPs.

La secuencia encontrada tiene una alta similaridad con las variantes OXA-499 descrita para aislados de *A. pittii* de Alemania (Kaase, Pfennigwerth, Lange, y Gatermann, 2015) y OXA-255 reportada en Estados Unidos (Zander et al., 2014). En particular, el gen *bla*_{OXA-143} fue muy similar en un 99 % con la secuencia de la variante OXA-499 de *A. pittii*; sin embargo, la variante presente en el país se diferencia por un cambio del aminoácido valina (GTG) en lugar de la metionina (ATG). Resultados que son corroborados con el análisis filogenético; en donde, el haplotipo encontrado en el presente estudio está más relacionado con las variantes reportadas para la especie *A. pittii* que con aquellas encontradas en *A. baumannii*. Además, el estudio demuestra que el *bla*_{OXA-143} se encuentra como grupo hermano del gen *bla*_{OXA-24/40}. Varios autores consideran que la enzima OXA-40 puede haber dado origen a la aparición de la enzima OXA-143 debido a que las dos enzimas están estrechamente relacionadas (Evans y Amyes, 2014; Opazo, Domínguez et al., 2012). Sin embargo, de acuerdo al análisis filogenético del presente estudio se demuestra todo lo contrario, el gen *bla*_{OXA-143} constituiría el ancestro del gen *bla*_{OXA-24/40}.

Por otro lado, el aislado clínico 15-1175 se caracterizó por no tener el gen intrínseco *bla*_{OXA-51} que es un marcador característico de *Acinetobacter baumannii*, aunque el mencionado gen también se ha reportado en otras especies. Por este motivo, se infiere que

el aislado podría no corresponder a la mencionada especie. Además, la variante encontrada en el país es muy diferente a las variantes OXA-143 que se reporta para la especie *A. baumannii* en Brasil y Honduras (Higgins et al., 2009; Zander et al., 2014), variante que comparte el 93 % de identidad con la variante OXA-182 proveniente de aislados clínicos de Corea (Kim et al., 2010). Por todo lo mencionado, el gen *bla*_{OXA-143} encontrado en el presente estudio podría constituir una nueva variante de una especie no *baumannii*, diferente a las reportadas en Sudamérica, pero similar, principalmente, con aquellas presentes en Europa. Esta información refuerza la idea de que este gen puede estar en diferentes especies del género y su presencia es mediada por plásmidos de alrededor 30 kb (Evans et al., 2013), por lo que, no se descarta su presencia en otras partes del país, así como en otros países a nivel de Sudamérica.

5.3.4. Gen de resistencia *bla*_{OXA-72} presente en *Acinetobacter* spp.

En el presente estudio, el gen *bla*_{OXA-24} fue identificado en seis aislados clínicos (11,5 %). La secuencia fue similar en un 100 % a la variante OXA-72 de *Acinetobacter baylyi* como primera opción, aunque también se la identificó con otras secuencias como OXA 72 y OXA-24 de *A. baumannii*, así como con otras especies que presentaron el mismo porcentaje de similaridad. A nivel de Sudamérica, la variante OXA-72 ha sido reportada en Colombia (Montealegre et al., 2012; Saavedra, Cayô, Gales, Leal, y Saavedra; 2014) y Brasil (de Sá Cavalcanti et al., 2013; Werneck, Picao, Carvalhaes, Cardoso, y Gales, 2011). En el país, esta variante fue documentada en la especie *A. baumannii* de aislados clínicos (Nuñez et al., 2016). La secuencia encontrada en el presente estudio tiene una alta similaridad (100 %) con la variante OXA-72 descrita anteriormente en el país. Con los resultados obtenidos se confirma la presencia de esta variante en el Ecuador y sería el tercer país de Sudamérica que reporta la presencia de la enzima OXA-72 en la región, hasta el momento.

Esta variante puede estar relacionada con la multirresistencia a los antibióticos, en particular, a los carbapenémicos (Frnolic-Kukina et al., 2011). En el presente estudio, la resistencia a imipenem, así como meropenem fue encontrada en los seis aislados en donde estuvo presente el gen. Similares resultados fueron reportados para *Acinetobacter baumannii* en Estados Unidos en donde el gen *bla_{OXA-72}* fue responsable de la alta resistencia a meropenem e imipenem (Sen y Joshi, 2015). Por otro lado, Kuo et al. (2013) mencionan que los niveles de ARNm OXA-72 incrementan no solo en presencia del imipenem sino también de ampicilina/sulbactam; por lo tanto, este es uno de los genes confiere resistencia no solo a los carbapenémicos sino también a otros β -lactámicos en *A. baumannii*.

La variante OXA-72 no solo ha sido identificada en la especie *Acinetobacter baumannii* sino también en otras especies del género. Entre las especies se reporta *A. pittii* (Atrouni, Joly-Guillou, Hamze, y Kempt, 2016; Bonnin, Docobo-Pérez, Poirel, Villegas, y Nordmann, 2014; Montealegre et al., 2012), *A. calcoaceticus* (Atrouni, Kempf et al., 2016) y *A. baylyi* (Lee et al., 2009). En el presente estudio, el gen fue detectado en el aislado 15-1175 que se caracterizó porque no presentó el gen *bla_{OXA-51}*. Por esta razón, se infiere que el gen puede estar presente en un aislado que pertenece a una especie no *baumannii*. Aunque los otros aislados presentaron el gen intrínseco *bla_{OXA-51}* no se puede afirmar que los aislados corresponda a *A. baumannii*, esto es porque varias especies del género como *A. pittii*, *A. calcoaceticus* y *A. lwoffii* también puede tener el gen *bla_{OXA-51}* (Périchon et al., 2014). De acuerdo al análisis filogenético, el gen *bla_{OXA-72}* no presenta una clara separación y está relacionado con diferentes especies como *A. baylyi* y *A. baumannii* que poseen la variante OXA-72, así como otras especies diferente al género como *Providencia rettgeri* y *Klebsiella pneumoniae* que tienen la variante OXA-24. Esta similaridad en la secuencia puede deberse a que no es muy informativa como para separar entre las variantes OXA-72 y OXA-24.

Por todo lo mencionado, la variante del gen *bla*_{OXA-72} puede estar presente en varias especies del género. La posible presencia de la variante del gen en varias especies de *Acinetobacter* se debe a que éste es diseminado mediante transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos de alrededor de 163 kb (Kuo et al., 2013; Montealegre et al., 2012). Por lo tanto, los aislados clínicos podrían servir como reservorios para que el gen se disemine entre otras especies de *Acinetobacter* (Saavedra et al., 2014), aumentando el riesgo a la resistencia a los carbapenémicos. Además, también se menciona que este gen tiene el potencial para una diseminación a partir de un clon epidémico, así como ocurre en Brasil (de Sá Cavalcanti et al., 2013). En el país, la variante ya ha sido reportada en *A. baumannii* por Nuñez et al. (2016) y en el presente estudio se reporta esta variante en *Acinetobacter* spp. en la ciudad de Quito. No se puede afirmar en que especie se encuentra el gen debido a que los aislados no fueron identificados molecularmente a nivel de especie. El gen al ser transferido por plásmidos no se descarta su rápida diseminación en otras ciudades, así como en otras especies del género.

5.3.5. Gen de resistencia *bla*_{OXA-58} presente en *Acinetobacter* spp.

El gen *bla*_{OXA-58} fue uno de los genes que se lo encontró en un alto porcentaje; sin embargo, su detección solo fue a nivel de PCR. No obstante, su importancia radica en que es uno de los genes que promueve la resistencia a los carbapenémicos (Sevillano et al., 2012). Además, el gen *bla*_{OXA-58} se caracteriza por una diseminación probablemente clonal con patrones particulares en cada lugar geográfico (Fu et al., 2014); en contraste, el gen *bla*_{OXA-23} que tiene una sola distribución clonal a nivel mundial (Higgins et al., 2010; Mugnier et al., 2010). En los últimos años, el gen *bla*_{OXA-58} ha sido reportado en países como Bolivia (Fernández et al., 2009; Sevillano et al., 2012) y Brasil (Figueiredo, Netto et al., 2011; de Souza et al., 2012), principalmente. En el Ecuador, este sería el primer reporte de

la presencia de la enzima OXA-58 en aislados clínicos de *Acinetobacter* spp., pero se debe confirmar su identidad mediante secuenciamiento.

La presencia de este gen explicaría la alta resistencia al imipenem y meropenem en aislados clínicos, resistencia que se incrementa por la presencia de los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51}. Especialmente, el gen *bla*_{OXA-58} media la resistencia al imipenem (Verma et al., 2011) aunque también se ha documentado que puede ejercer resistencia para otros antibióticos como la amikacina (Fu et al., 2014) y piperacilina/tazobactam (Chen, Chang et al., 2010). La enzima OXA-58 por sí sola no es suficiente para conferir resistencia a los carbapenémicos, necesita la presencia de otros mecanismos (Evans et al., 2013). Por esta razón, el gen *bla*_{OXA-58} es uno de los responsables en conjunto con otras oxacilinasas en generar resistencia a los carbapenémicos como los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51}. Otros estudios indican que el gen *bla*_{OXA-58} se encuentra coexistiendo solo con el gen *bla*_{OXA-23} (Figueiredo, Netto et al., 2011; Fu et al., 2014), con el gen *bla*_{OXA-51} (Vahaboglu et al., 2006) o se lo ha reportado solo (Evans, Hamouda, Towner, y Amyes, 2010; Fernández et al., 2009; Koh et al., 2007). La actividad enzimática de la enzima OXA-58 es más baja que la OXA-23, por lo que esta última contribuye con la resistencia a los dos carbapenémicos (Wu et al., 2015).

Varios autores como Evans et al. (2010), Fu et al. (2014), Silva et al. (2015) mencionan que este gen puede ser transferido gracias al elemento de inserción *IS**Aba3* que le permite diseminar la resistencia antibiótica. Otros autores mencionan su presencia en integrones clase 1 (Fernández et al., 2009). La amplia distribución del gen presente en diferentes aislados clínicos asegura su capacidad de ser transferido mediante plásmidos entre diferentes especies del género (Chen, Chang et al., 2010; Sevillano et al., 2012; Vahaboglu et al., 2006). El gen ha sido reportado en varias especies como *A. pittii* (Evans et al., 2010; Fu et al., 2014;

Silva et al., 2016), *A. nosocomialis* (Chen, Chan et al., 2010; Fu et al., 2014) y *A. johnsonii* (Silva et al., 2016), por lo que, la posible presencia del gen puede estar asociado a diferentes especies del género.

5.3.6. Gen de resistencia *bla*_{GES} presente en *Acinetobacter* spp.

El gen *bla*_{GES} también ha sido reportado en *Acinetobacter* spp. (Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2011) como responsable de la hidrólisis de los carbapenémicos (Charfi-Kessiss et al., 2014). La enzima GES tiene una amplia diseminación mediada principalmente por plásmidos (Bogaerts et al., 2010; Bonnin et al., 2011). Sin embargo, en el presente estudio a pesar de que se obtuvo un producto de PCR en dos aislados clínicos, los resultados del secuenciamiento determinan que los *primers* utilizados no identificaron el gen de resistencia; por el contrario, detectaron genes presentes en el cromosoma de *Acinetobacter* spp. Los *primers* utilizados probablemente no son específicos y por ello no reconocieron el gen de resistencia *bla*_{GES} y se acoplaron a otra región del cromosoma. Autores como Opazo, Sonnevend et al. (2012) no determinaron la presencia del gen *bla*_{GES} con los mismos *primers* utilizados en el presente estudio. Otros estudios que utilizan el *primer forward* (5`ATGCGCTTCATTACGCAC`3) que fue el mismo que se utilizó en el estudio identificaron las diferentes variantes del gen *bla*_{GES}; sin embargo, esos estudios utilizaron un *primer reverse* diferente (5`CTATTTGTCCGTGCTCAGGA`3) (Cicek et al., 2013; Moubareck et al., 2009). Por lo que, para determinar la posible presencia del gen *bla*_{GES} se debería diseñar y sintetizar otros *primers*.

5.4. Genes de resistencia de las metalo- β -lactamasas en *Acinetobacter* spp.

Las enzimas metalo- β -lactamasas están presentes en algunas partes del mundo (Shrestha et al., 2015). Su identificación puede ser tanto fenotípica como molecular. En el

presente estudio, el análisis fenotípico no fue capaz de detectar metalo- β -lactamasas, pero a nivel molecular se detectó al gen *bla_{SIM}* proveniente de un aislado clínico. Por lo que, la producción de carbapenemasas no solo se debe basar en el perfil de resistencia o pruebas fenotípicas sino también se debe incluir el análisis molecular para tener un resultado confirmatorio. Navarro et al. (2011) mencionan que se podría mejorar el método fenotípico y aumentar la sensibilidad de esta prueba mediante pruebas de aproximación de discos utilizando discos de carbapenémicos combinados con EDTA y tirillas de microgradiente como el *Etest*, utilizar fenantrolina o sustituir EDTA por compuestos tiólicos como el mercaptopropiónico. Adicionalmente, se ha sugerido la suplementación de zinc en el medio, pero esta modificación no ha sido ampliamente evaluada (Miriagou et al., 2010). Las dificultades en la detección fenotípica o genotípica pueden llevar a subestimar la estimación de la presencia de las carbapenemasas en *Acinetobacter* spp.

En el presente estudio se determinó la presencia del gen *bla_{SIM}* en el aislado clínico 15-1175 (1,9 %) mediante PCR, pero no fue posible su identificación mediante secuenciamiento; por lo tanto, su presencia e identidad aún es cuestionable. A nivel fenotípico no se detectó la presencia de ninguna metalo- β -lactamasas tanto de aislados clínicos como ambientales. Esto probablemente se deba a que la detección mediante PCR es más sensible. El gen *bla_{SIM}* es uno de los genes menos reportados a nivel mundial, su presencia está restringida en países como China y Corea (Kim et al., 2013; Lee et al., 2010; Sun et al., 2016; Zhou et al., 2011).

La enzima SIM se caracteriza por conferir resistencia a los carbapenémicos en *Acinetobacter* spp. (Kim et al., 2013; Zhou et al., 2011), en particular al imipenem (Kim et al., 2013; Sun et al., 2016). La presencia del gen *bla_{SIM}* puede incrementar la resistencia a los carbapenémicos cuando existe una coexpresión con otras carbapenemasas de clase D,

por ejemplo, de la enzima OXA-23 (Zhou et al., 2011). En el presente estudio se encontró una co-resistencia del gen *bla_{SIM}* con los genes *bla_{OXA-143}* y *bla_{OXA-72}*, la presencia de los tres genes de resistencia incrementaría la resistencia a los carbapenémicos en el mencionado aislado. Esta relación explicaría la resistencia al imipenem que presenta el aislado. Hasta el momento, no se ha reportado la co-resistencia de los genes antes mencionados. El gen *bla_{SIM}* está presente principalmente en integrones clase 1 que son transportados por plásmidos (Kim et al., 2013; Sun et al., 2016) Por esta razón, el gen ha sido reportado en diferentes especies de *Acinetobacter* como *A. baylyi* (Zhou et al., 2011), *A. genomoespecie* 10 (Lee et al., 2010), *A. pittii* y *A. nosocomialis* (Kim et al., 2013). Por lo que, la posible presencia del gen en el aislado 15-1175 como se mencionó anteriormente sería de una especie no *baumannii*; por otro lado, si se confirma su identidad, la presencia de este gen sería el primer reporte tanto en el país como a nivel de región. Por lo tanto, se debe identificarlo y clasificarlo correctamente para corroborar su presencia o no en el país.

Aunque se obtuvo un producto de PCR para el gen *bla_{SPM}*, su secuencia no corresponde al gen de resistencia esperado. Los *primers* F/5'-AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG-3' y R/5'-ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG-3' reconocieron una región del cromosoma que codifica una proteína hipotética en *Acinetobacter baumannii*. Estos *primers* han sido usados para detectar la enzima en *A. baumannii* por varios autores como Safari et al. (2015), en donde no han obtenido producto de PCR alguno. Por otro lado, los *primers* han sido usados ampliamente para la amplificación del gen en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* (Sheikh et al., 2014). La presencia de la enzima ha sido detectada en *A. baumannii*, pero con *primers* diferentes (Shahcheraghi et al., 2011). Diferentes factores pueden haber intervenido en el resultado obtenido, como, por ejemplo, la temperatura *annealing* no fue la adecuada para los

mencionados *primers*, los *primers* no son específicos o están mal diseñados; en particular, para los aislados de *Acinetobacter* spp. del presente estudio.

Finalmente, en el presente estudio, no se detectó el gen *bla_{GIM}* tanto para aislados clínicos como ambientales. La enzima GIM es la menos reportada de las metalo-β-lactamasas. Similar a otros estudios en donde incluyen la detección del gen (Hakemi et al., 2014; Khorsi et al., 2015; Qu, Du, Yu, y Lü, 2016) pero con resultados negativos. La enzima es endémica de Alemania (Zhao y Hu, 2015); hasta el momento, no se ha reportado el gen *bla_{GIM}* en Sudamérica. Actualmente, el gen ha sido reportado en *Pseudomonas aeruginosa* (Castanheira, et al., 2004), varias especies de la familia Enterobacteriaceae (Hamprecht et al., 2013; Kaase et al., 2014; Wendel et al., 2013) y *Acinetobacter pittii* (Kaase et al., 2014). Finalmente, el gen *bla_{GIM}* está principalmente en plásmidos (Kaase et al., 2014) aunque también se lo ha reportado en un integrón del cromosoma (Wendel y MacKenzie, 2015) pero su diseminación actual está en Alemania.

5.5. Gen de resistencia presente en *Acinetobacter* spp. de aislados ambientales

Este es el primer reporte sobre la detección de genes de resistencia presentes en *Acinetobacter* spp. procedente de muestras ambientales. Uno de los genes que se detectó e identificó fue el gen *bla_{OXA-51}* con dos diferentes haplotipos. Otro gen presente en las aguas de río fue *bla_{OXA-58}*; sin embargo, no fue posible su identificación mediante secuenciación. En Sudamérica, la presencia del gen *bla_{OXA-51}* en el ambiente ha sido reportado en conjunto con *bla_{OXA-23}* de aislados de *A. baumannii* proveniente de aguas residuales hospitalarias (Ferreira et al., 2011). Sin embargo, en aislados de río se ha encontrado otros genes como el gen *bla_{OXA-23}*, en particular, en sitios de descarga de aguas residuales (Goic-Barisic, Hrenovic, Kovacic, y Seruga, 2016), lejos del sitio de descarga de aguas residuales (Girlich

et al., 2010; Silva et al., 2016), así como de ríos (Silva et al., 2016). Por otro lado, el gen *bla*_{OXA-58} no ha sido reportado en ríos ni aguas residuales (Goic-Barisic et al., 2016), pero si se ha reportado su presencia en agua potable (Silva et al., 2016). En aislados ambientales, la presencia de los genes *bla*_{OXA} promovieron la resistencia solo al imipenem. En particular, el gen *bla*_{OXA-51} se expresa en presencia de elementos de inserción o cuando un gen *bla*_{OXA} adquirido está presente (Lopes et al., 2012), así como de los mecanismos de resistencia intrínseca (Shrestha et al., 2015; Wong et al., 2009).

Para el gen *bla*_{OXA-51} procedentes de aislados ambientales se identificó dos haplotipos 4 y 5 que se ubicaron en diferentes posiciones dentro del clado que conforma las variantes del gen *bla*_{OXA-51}. De acuerdo al análisis filogenético, los dos haplotipos se agruparon junto con secuencias de origen clínico. Aunque el haplotipo 4 presenta tres cambios aminoacídicos en las posiciones 105, 114 y 115 con respecto a la secuencia de la variante OXA-94, este haplotipo se agrupó en el clado integrado por los haplotipos 1 y 2 de origen clínico. A nivel de secuencias de aminoácidos, los tres haplotipos son iguales; en particular, los haplotipos presentan tres residuos de aminoácidos leucina (L), lisina (K) y alanina (A) que los diferencia de las variantes reportadas en el *GenBank*. Por lo que, el haplotipo cuatro puede ser una nueva variante y su origen probablemente es clínico, así como, los haplotipos 1 y 2 que se los detectó en aislados clínicos.

Por otro lado, el haplotipo 5 presentó dos aminoácidos diferentes con respecto a la secuencia de la variante OXA-259. De acuerdo al análisis filogenético, el haplotipo 5 no se relacionó con la mencionada variante, pero si se agrupó en un solo subclado con el haplotipo 3 de origen clínico. Los dos haplotipos comparten dos residuos de aminoácidos, lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 114 y 115, aminoácidos característicos de las secuencias encontradas en el presente estudio. Sin embargo, estas dos secuencias se diferencian de los

haplotipos 1, 2 y 4 por dos o tres cambios de aminoácidos. De acuerdo al análisis filogenético, el haplotipo 5 constituye otra variante del gen *bla_{OXA-51}*, así como el haplotipo 3 de origen clínico. Por lo tanto, las variantes del gen *bla_{OXA-51}* tanto de aislados clínicos como ambientales al tener dos aminoácidos propios de las secuencias del presente estudio, diferentes a las secuencias de referencia del *GenBank*, se las puede considerar como nuevas variantes no reportadas hasta el momento.

Los dos haplotipos ambientales por sus características posiblemente tienen un origen clínico como resultado de las actividades humanas. Similar a otro estudio, en donde identificaron diferentes genes de resistencia, entre los que se menciona a *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-23}* y *bla_{OXA-24}*, provenientes de aislados ambientales. En base al análisis filogenético, los autores infirieron que los diferentes genes de resistencia encontrados fueron de origen clínico (Goic-Barisic et al., 2016). La presencia del gen *bla_{OXA-51}*, posiblemente de origen clínico, en el ambiente tiene varias implicaciones, las mismas que fueron analizadas en el punto 5.1.2. Razón por la cual, la presencia de aislados clínicos en el medio ambiente pueden actuar como reservorio de genes de resistencia de importancia clínica (Girlich et al., 2010). En particular, los genes de resistencia encontrados en aislados ambientales pueden ser de *Acinetobacter baumannii*; sin embargo, su identidad debe ser confirmada mediante un análisis molecular.

5.6. Relaciones filogenéticas de los cuatro genes de resistencia *bla_{OXA}*

De acuerdo al análisis filogenético, los genes *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-23}* fueron clados hermanos. Similares resultados fueron encontrados en un estudio en donde analizaron las relaciones de genes *bla_{OXA}* encontrados en *A. baumannii* procedente de aguas residuales (Goic-Barisic et al., 2016). Por lo general, el análisis de las relaciones se las infiere utilizando

secuencia de aminoácidos (Brown y Amyes, 2005; Evans y Amyes, 2014; Perichón et al., 2013; Poirel et al., 2010). De acuerdo a este tipo de análisis la variante OXA-51 es grupo hermano de la variante OXA-24 y en conjunto son grupos hermanos de OXA-23 (Brown y Amyes, 2005). Por otro lado, los genes *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-143} se agruparon en un solo clado que indican que tiene el mismo ancestro en común, en donde se indica que el gen *bla*_{OXA-143}; en particular, la secuencia de la variante OXA-253 sería la secuencia más ancestral. Estudios en donde incluyan en su topología las secuencias nucleotídicas del gen *bla*_{OXA-143} no se han reportado hasta el momento. Sin embargo, se han reportado el análisis filogenético en base a secuencias de aminoácidos en donde incluyen la variante OXA-143. En el estudio, los autores mencionan que la enzima OXA-40 sería el ancestro de la variante antes mencionada (Evans y Amyes, 2014). Las topologías de árboles generados con secuencias nucleotídicas no son comparables con árboles inferidos con secuencias de aminoácidos. Esto es porque el análisis con secuencias nucleotídicas dan una información más precisa sobre las mutaciones en el genoma; por lo que, este tipo de análisis es útil para inferir el ancestro (Abascal, Zardoya, y Telford, 2010). Por otro lado, debido a la alta variabilidad del gen que codifica la enzima OXA-51 es recomendable incluir un análisis de secuencias aminoacídicas. En general, los genes analizados en el presente estudio señalan que todos los genes *bla*_{OXA} provienen de un ancestro en común, similar al estudio de Goic-Barisic et al. (2016).

6. CONCLUSIONES

Los aislados de *Acinetobacter* spp. fueron principalmente de la población pediátrica asociada a la unidad de cuidados intensivos y de muestras provenientes de secreción traqueal.

El aislamiento y la identificación de las especies de *Acinetobacter* provenientes de muestras ambientales fue difícil con las técnicas microbiológicas convencionales utilizadas en el presente estudio. En particular, el medio *CHROMO AGAR* no fue selectivo para el aislamiento de las especies de este género. Por otro lado, la identificación preliminar de *Acinetobacter* spp. fue posible gracias al método automatizado *VITEK-2*; sin embargo, no fue posible determinar la presencia de las especies que conforman el complejo *A. calcoaceticus/A. baumannii*.

Acinetobacter spp. fue aislado de cuatro ríos, Monjas, Machángara, Pita y San Pedro, cercanos a viviendas. La presencia de bacterias de origen clínico como *A. baumannii* genera preocupación a nivel de salud debido a su multirresistencia antibiótica que presenta. Además, esta bacteria al estar en un ambiente adecuado como el agua puede diseminar fácilmente los determinantes genéticos de resistencia entre especies del mismo género, así como con especies de otros géneros.

Acinetobacter spp. de aislados clínicos fueron resistentes a los carbapenémicos, imipenem y meropenem, así como a otros β -lactámicos más inhibidores como piperacilina/tazobactam y ampicilina/sulbactam. Por otro lado, *Acinetobacter* spp. de aislados ambientales fueron resistentes al imipenem y susceptibles a la tobramicina, gentamicina y ampicilina/sulbactam; mientras que, para otros antibióticos fueron intermedios.

En aislados clínicos, el presente estudio reporta altos porcentajes de los genes *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} y *bla*_{OXA-23}; mientras que, los genes *bla*_{SIM}, *bla*_{OXA-72} y *bla*_{OXA-143} fueron detectados en bajos porcentajes. De los cuales, no fue posible la identificación de los genes *bla*_{OXA-58} y *bla*_{SIM} mediante secuenciamiento. Aunque los genes *bla*_{SPM} y *bla*_{GES} amplificaron un producto de PCR, no corresponde a los genes de resistencia esperados. Finalmente, el gen *bla*_{GIM} no fue detectado. Todos los genes detectados, en particular, los genes *bla*_{OXA} fueron relacionados con la alta resistencia a los carbapenémicos, imipenem y meropenem, así como otros β-lactámicos.

En aislados ambientales, el presente estudio reporta la presencia de dos genes *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58}. De los cuales no fue posible la identificación del gen *bla*_{OXA-58} mediante secuenciamiento. Aunque el gen *bla*_{SPM} amplificó un producto de PCR, no fue el gen de resistencia esperado. Finalmente, los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-72} y *bla*_{OXA-143} no fueron detectados. Los genes *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58} fueron relacionados con la alta resistencia al imipenem.

De todos los genes identificados, se detectó al menos cinco variantes del gen *bla*_{OXA-51} que se caracterizan por la presencia de dos residuos aminoacídicos, lisina y alanina, que no se encuentran en otras variantes reportadas anteriormente. Las variantes procedentes de aislados ambientales tienen un origen clínico de acuerdo al análisis filogenético. Además, estas nuevas variantes pueden estar presentes en especies de *Acinetobacter baumannii* como en no *baumannii*.

Por otro lado, el gen *bla*_{OXA-24} corresponde a la variante OXA-72 y fue similar a la secuencia reportada anteriormente en el país; así como el gen *bla*_{OXA-23} que corresponde a la

variante OXA-23. Las dos enzimas pueden estar presentes en diferentes especies de *Acinetobacter*.

El gen *bla*_{OXA-143} presentó una alta similaridad con la variante OXA-499 presente en *A. pittii*, la misma que se caracterizó por presentar un cambio de valina en vez de metionina en la posición 94 de la secuencia de aminoácidos; además, esta nueva variante puede estar presente en un aislado no *baumannii*.

En cuanto al análisis filogenético, todos los genes que codifica a oxacilinasas provienen de un mismo ancestro. Lo más característico fue que los genes que codifican las OXA-23 y OXA-51 se agruparon como clados hermanos; mientras que, los genes que codifican las enzimas OXA-143 y OXA-72 se agruparon en el mismo clado. Por lo que, los genes *bla*_{OXA-143} y *bla*_{OXA-24} tendría el mismo ancestro que las originó.

Finalmente, la producción de OXA-23, OXA-51, OXA-72 y OXA-143 y la posible expresión de las enzimas OXA-58 y SIM representa una amenaza emergente a la resistencia a los carbapenémicos en Ecuador. Además, la posible presencia de bacterias de origen clínico en ambientes como ríos aumenta la preocupación debido a que la resistencia puede ser diseminada, contaminando las fuentes de agua y promoviendo brotes epidémicos.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con una vigilancia constante de *Acinetobacter* spp. en los diferentes hospitales no solo de aislados clínicos sino también en fómites hospitalarios cuando lo amerite para su posterior control y sistemas de prevención. Por otro lado, es de vital importancia el monitoreo de aguas residuales proveniente de diferentes fuentes, así como de aguas de ríos lejanos a zonas de descarga.
- Para una identificación correcta de las especies de *Acinetobacter* se recomienda el uso de técnicas y marcadores moleculares como 16S rRNA, *rpoB* y *gyrB*. Esto es porque las técnicas bioquímicas se basan en la actividad metabólica de las bacterias, las mismas que se puede compartir entre diferentes especies del género; por lo que, este tipo de pruebas no es específico para una especie en particular.
- A nivel fenotípico, la determinación de las enzimas carbapenemasas es complicada debido a que en base a métodos fenotípicos no se puede determinar la presencia de oxacilinasas. Aunque a nivel fenotípico se puede determinar las enzimas metalo- β -lactamasas y serin- β -lactamasas, las pruebas no garantizan la presencia de las mismas. Por lo tanto, se recomienda que la determinación de las carbapenemasas sea a nivel molecular. Una vez que se determina la presencia de los genes que codifican estas enzimas es importante secuenciarlas con el fin de caracterizarlas, identificarlas adecuadamente y comprobar que la secuencia corresponda al gen buscado.
- En conjunto con la identificación de los genes de resistencia a los carbapenémicos es importante la detección de los diferentes aislados ya sea clínicos o ambientales a nivel de especie. Por lo que, se recomienda que la identificación sea a nivel molecular debido a que el uso de técnicas microbiológicas solo permite la identificación a nivel de género.

- Las relaciones filogenéticas del presente estudio fueron elaboradas en base a las secuencias nucleotídicas cuyos resultados no son comparables con un análisis en base a secuencias aminoacídicas; por lo que, se recomienda realizar un análisis filogenético utilizando tanto secuencias nucleotídicas como aminoacídicas, en particular, porque los genes de resistencia son altamente variables con mutaciones que afectan a nivel fenotípico.
- Debido a que varios aislados comparten genes de resistencia, se recomienda realizar análisis de clonalidad en base a técnicas moleculares; como, por ejemplo, el uso de la técnica de electroforesis de campo pulsados o REP-PCR, entre otras.

8. REFERENCIAS

- Abascal, F., Zardoya, R., y Telford, M. (2010). TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Research*, 38(2), 7-13. doi: 10.1093/nar/gkq291
- Abbott, I., Cerqueira, G., Bhuiyan, S., y Peleg, A. (2013). Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Laboratory Challenges, Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies. *Expert Reviews Anti-infective Therapy*, 11(4), 395-409. doi: Recuperado de <http://www.febri-notropeni.net/newsfiles/3649Acinetobacter.pdf>
- Adams, M., Chan, E., Molyneaux, N., y Bonomo, R. (2010). Genomewide Analysis of Divergence of Antibiotic Resistance Determinants in Closely Related Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 3569-3577. doi: 10.1128/AAC.00057-10
- Ajao, A., Robinson, G., Lee, M., Ranke, T., Venezia, R., Furuno, J., ... Johnson, K. (2011). Comparison of culture media for detection of *Acinetobacter baumannii* in surveillance cultures of critically-ill patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(11), 1425-1430. doi: 10.1007/s10096-011-1237-7
- Akers, K., Barsoumian, A., Beckius, M., Murray, C., y Mende, K. (2010). CHROMagar *Acinetobacter* is not selective for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 67(2), 209-211. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.004
- AL-Saffar, A., Alahmed, S., Alwesawei, Y., y Mahdi, R. (2015). *Acinetobacter baumannii*: Isolation, Identification and Antimicrobial Resistance. *International Journal of Recent*

Scientific Research, 6(4), 3766-3773. Recuperado de <http://www.recentscientific.com/sites/default/files/2341.pdf>

Alemán, W., Cevallos, S., Izquierdo, K., Peña, C., y Vanegas, P. (2011). Infecciones Hospitalarias en la Unidad de Cuidados Intensivos de Hospital Alcívar. *Revistas Actas Médicas*, 21(1), 13-20. Recuperado de <http://hospitalalcivar.com/uploads/pdf/Infecciones%20Hospitalarias%20en%20UCI%20no%2021%20vol%201.pdf>

Ali, S., Kumar, G., Shoket, H., y Kumar, M. (2014). 16S rRNA Gene-based Identification and Antibiotic Resistance Profiling of *Acinetobacter baumannii* from River Water Isolate, Dehradun, India. *International Journal of Life Sciences*, 3(3), 157-162. doi: 10.5958/2319-1198.2014.01100.2

Aliakbarzade, K., Farajnia, S., Nik, A., Zarei, F., y Tanomand, A. (2014). Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(10), 1-6. doi: 10.5812/jjm.11924

Almasaudi, S. (2016). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*. doi:10.1016/j.sjbs.2016.02.009

Anwar, M., Ejaz, H., Zafar, A., y Hamid, H. (2016). Phenotypic Detection of Metallo-Beta-Lactamases in Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from Pediatric Patients in Pakistan. *Journal of pathogens*, 2016, 1-7. doi: 10.1155/2016/8603964

- Atrouni, A., Joly-Guillou, M., Hamze, M., y Kempf, M. (2016). Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebano. *New Microbe and New Infections*, 12, 43-44. doi: 10.1016/j.nmni.2016.04.005
- Atrouni, A., Kempf, M., Eveillard, M., Rafei, R., Hamze, M., y Joly-Guillou, M. (2016). First report of Oxa-72-producing *Acinetobacter calcoaceticus* in Lebanon. *New Microbe and New Infections*, 9, 11-12. doi: 10.1016/j.nmni.2015.11.010
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146917/>
- Álvarez-Hernández, D., Garza-Mayén, G., y Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 499-504. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v32n5/art02.pdf>
- Amudhan, M., Sekar, U., Kamalanathan, A., y Balaraman, S. (2012). blaIMP and blaVIM mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6(11), 757-762. doi:10.3855/jidc.2268
- Arber, W. (2014). Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life*, 4(2), 217-224. doi:10.3390/life4020217
- Ardebili, A., Rastegar, A., Beheshti, M., y Rastegar, E. (2015). Association between mutations in *gyrA* and *parC* genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and

ciprofloxacin resistance. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 18(6), 623-626.

Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509960/>

Antunes, L., Visca, P., y Towner, K. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292-301. doi: 10.1111/2049-632X.12125

Ayala, S. (2011). *Detección de genes que codifican la resistencia a carbapenemes (tipo Serin- β -lactamasas) en Pseudomonas aeruginosa* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5356/T-PUCE-5582.pdf;jsessionid=7B6901D709964A77192549A2F3470069?sequence=1>

Balouiri, M., Sadiki, M., y Koraichi., S. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bahador, A., Raoofian, R., Pourakbari, B., Taheri, M., Hashemizadeh, Z., y Hashemi, F. (2015). Genotypic and Antimicrobial Susceptibility of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Analysis of IS*Aba* Elements and *bla*_{OXA-23-like} Genes Including a New Variant. *Frontiers in Microbiology*, 6(1249), 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2015.01249

Barsoumian, A., Calvano, T., Markelz, A., Cassidy, R., Murray, C., Beckius, M., ... Akers, K. (2013). Variations of CHROMagar *Acinetobacter* to detect imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*-*calcoaceticus* complex. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 45(6), 446-452. doi: 10.3109/00365548.2013.759270

- Beceiro, A., Tomás, M., y Bou, G. (2013). Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 185-230. doi: 10.1128/CMR.00059-12
- Bernal, P., Molina-Santiago, C., Daddaoua, A., y Llamas, M. (2013). Antibiotic adjuvants: identification and clinical use. *Microbial Biotechnology*, 6(5), 445-449. doi:10.1111/1751-7915.12044
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D., y Piddock, L. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Natural Review of Microbiology*, 13(1), 42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- Bogaerts, P., Naas, T., Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., ... Glupczynski, Y. (2010). GES extended-spectrum β -Lactamases in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4872-4878. doi: 10.1128/AAC.00871-10
- Bonnin, R., Docobo-Pérez, F., Poirel, L., Villegas, M., y Nordmann, P. (2014). Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(2), 195-196. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.005
- Bonnin, R., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J., y Poirel, L. (2011). Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 349-354. doi: 10.1128/AAC.00773-10

- Boo, T., y Crowley, B. (2009). Detection of *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-23-like} genes in carbapenem-susceptible *Acinetobacter* clinical isolates: should we be concerned?. *Journal of Medical Microbiology*, 58(6), 839-841. doi: 10.1099/jmm.0.008904-0
- Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings of Royal Society B*, 277(1683), 1-9. doi: 10.1098/rspb.2009.1679
- Breitinger., H. (2012). Drug Synergy –Mechanisms and Methods of Analysis. En W. Acree (Ed.), *Toxicity and Drug Testing* (pp. 143-166). doi: 10.5772/30922
- Brooker, R. (2012). *Genetics Analysis & Principles* (4a Ed.). New York: USA: McGraw-Hill
- Brooks, G., Butel, J., Carroll, K., Morse, S., y Mietzner, T. (2014). *Microbiología Médica* (26ª Ed.). México: McGraw-Hill.
- Brown, S., y Amyes, S. (2005). The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clinical Microbiology Infections*, 11(4), 326-329. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01096.x
- Bush, K. y Jacoby, G. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., y Bai, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1607-1615. doi: 10.1093/jac/dks084.

- Cambray, G., Guerout, A., y Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 141-166. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163504
- Carattoli, A. (2013). Plasmid and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 298-304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001
- Carvalho, R., Marques, S., Goncalves, L., Abreu, A., Monteiro, S., y Gonçalves, A. (2013). Phenotypic detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(4), 506-509. doi: 10.1590/0037-8682-1451-2013
- Castanheira, M., Toleman M., Jones, R., Schmidt, F., y Walsh T. (2004). Molecular Characterization of a β -lactamase Gene, *bla*_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4654-4661. doi: 10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004
- Catel-Ferreira, M., Coadou, G., Molle, V., Mugnier, P., Nordman, P., Siroy, A., ... Dé, E. (2011). Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 2053-2056. doi: 10.1093/jac/dkr267
- Cayô, R., Merino, M., Ruiz del Castillo, B., Cano, M., Calvo, J., Bou, G., y Martínez-Martínez, L. (2014). OXA-207, a Novel OXA-24 Variant with Reduced Catalytic Efficiency against Carbapenems in *Acinetobacter pittii* from Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4944-4948. doi: 10.1128/AAC.02633-13

- Charfi-Kessiss, K., Mansour, W., Haj, A., Mastouri, M., Nordmann, P., Aouni, M., y Poirel, L. (2014). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the *bla*_{OXA-23} and the *bla*_{GES-11} genes in a neonatology center in Tunisia. *Microbial Pathogenesis*, 74, 20-24. doi: 10.1016/j.micpath.2014.07.003
- Chen, T., Chang, W., Kuo, S., Lee, Y., Chen, C., Siu, L., ... Fung, C. (2010). Contribution of a Plasmid-Borne *bla*_{OXA-58} Gene with its Hybrid Promoter Provided by IS1006 and an IS*Aba3*-like Element to β -Lactam Resistance in *Acinetobacter* Genomic Species 13TU. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), 3107-3112. doi: 10.1128/AAC.00128-10
- Chen, T., Lee, Y., Kuo, S., Hsueh, P., Chang, F., Siu, L., ... Fung, C. (2010). Emergence and Distribution of Plasmids Bearing the *bla*_{OXA-51}-Like Gene with an Upstream IS*Aba1* in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4575-4581. doi:10.1128/AAC.00764-10
- Chen, Z., Qiu, S., Wang, Y., Wang, Y., Liu, S., Wang, Z., ... Huang, L. (2011). Coexistence of *bla*_{NDM-1} with the Prevalent *bla*_{OXA23} and *bla*_{IMP} in Pan-drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in China. *Clinical Infectious Diseases*, 52(5), 692-693. doi: 10.1093/cid/ciq231
- Chihi, H., Bonnin, R., Bourouis, A., Mahrouki, S., Besbes, S., Moussa, M., ... Naas, T. (2016). GES-11-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Tunisian hospitals: Long-term dissemination of GES-type carbapenemases in North Africa. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 5, 47-50. doi: 10.1016/j.jgar.2016.03.005

- Cicek, A., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A., Peleg, A., y Sandalli, C. (2013). OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20, 410-415. doi: 10.1111/1469-0691.12338
- Ciftci, A., Karakece, E., Atasoy, A., Asik, G., y Ciftci, I. (2015). Culture Media for Detection of *Acinetobacter baumannii* Selective Media for Detection of *A baumannii*. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 2(3), 1-4. Recuperado de <http://medcraveonline.com/JMEN/JMEN-02-00046.pdf>
- Cilveti, C., Rivera, M., Rodríguez, M., y Alcocer, I. (2013). Inhibición de enterobacterias portadoras de carbapenemasas con secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34, 85-98. Recuperado de [http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/Recursos/publicaciones/Cientifica/Cilveti_et al_2013.pdf](http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/Recursos/publicaciones/Cientifica/Cilveti_et_al_2013.pdf)
- Corona, F., y Martinez, J. (2013). Phenotypic Resistance to Antibiotics. *Antibiotics*, 2(2), 237-255. doi:10.3390/antibiotics2020237
- Coyne, S., Courvalin, P., y Périchon, B. (2011). Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 947-953. doi: 10.1128/AAC.01388-10
- Cuaical, N., Delgado, Y., Anzola, Y., Marcano, D., Zamora, D., y Torres, L. (2012). Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Revista de la Sociedad*

Venezolana de Microbiología, 32(2), 95-110. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000200004

Dall, G., Gutberlet, A., Augustini, J., Ecker, L., Campos, R., Westphal, G., y Condeixa, P. (2015). Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(6), 699-705. doi: 10.1590/0037-8682-0233-2015

Davies, J., y Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10

Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. doi:10.1038/nmeth.2109

Demir, Y., Zer, Y., y Karaoglan, I. (2015). Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC and OXA-48 enzymes in Enterobacteriaceae strains. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(3), 1127-1133. Recuperado de <http://www.pjps.pk/wp-content/uploads/pdfs/28/3/Supplementary/17-SUP-267.pdf>

Ellington, M. J., Kistler, J., Livermore, D. M., y Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 321-322. doi: 10.1093/jac/dkl481

Elsaied, H., y Maruyama, A. (2011). Diversity and Role of Bacterial Integron/Gene Cassette Metagenome in Extreme Marine Environments. En F. de Bruijn (Ed.), *Handbook of*

Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=ITqc74o1W4sC&pg=PA309&lpg=PA309&dq=integrans+Bruijn,+2011&source=bl&ots=Q6tFHc4zCY&sig=1msi_EJAvBAEP8ysy_h8ABpF9TE&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwir5ZbiypjOAhXJ7B4KHfbjDjMQ6AEIOTAE#v=onepage&q=integrans%20Bruijn%2C%202011&f=false

de Sá Cavalcanti, F., Soares, A., Anselmo, M., de Moraes, M., Camargo, M., y Leal-Balbino, T. (2013). Emergence of extensively drug-resistant OXA-72–producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination?. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 250-251. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.022

de Souza, C., Martins, L., Muner, L., Padilha, D., Einsfeld, A., y Corção, G. (2012). First occurrence of *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 243-246. doi: 10.1590/S1517-83822012000100027

Diane, S., y Rolain, J. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 831-838. doi: 10.1111/1469-0691.12655

Doughari, H., Ndakidemi, P., Human, I., y Benade, S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and Environment*, 26, 101-112. doi: 10.1264/jsme2.ME10179

Dropa, M., Balsalobre, L., Lincopan, N., Mamizuka, E., Cassettari, V., Matté, G., y Matté, M. (2010). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron

associated *bla*_{GES-7} in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 630-632. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02944.x

Esterly, J., Richardson, C., Eltoukhy, N., Qi, C., y Scheetz, M. (2011). Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii*. *The Annals of Pharmacotherapy*, 45, 218-228. doi: 10.1345/aph.1P084

Evans, B., y Amyes, S. (2014). OXA-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241-263. doi:10.1128/CMR.00117-13

Evans, B., Hamouda, A., y Amyes, S. (2013). The Rise of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Current Pharmaceutical Design*, 19(2), 224-238. doi: 10.2174/13816128130204

Evans, B., Hamouda, A., Towner, K., y Amyes, S. (2010). Novel genetic context of multiple *bla*_{OXA-58} genes in *Acinetobacter* genospecies 3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1586-1588. doi: 10.1093/jac/dkq180

Fedoroff, N. (2012). Transposable Elements, Epigenetics, and Genome Evolution. *Association Affairs*, 338(6108), 758-767. doi: 10.1126/science.338.6108.758

Fernández, E., Bustamante, Z., Zamora, J., Zabalaga, S., Pinto, J., Funes, F., ... Gallego, L. (2009). Determinación de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* de hospitales de la ciudad de Cochabamba. *BIOFARBO*, 17(1), 30-38. Recuperado de <http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rbfb/v17n1/v17n1a05.pdf>

- Ferreira, A., Marchetti, D., De Oliveira, L., Gusatti, C., Fuentefria, D., y Corção, G. (2011). Presence of OXA-23-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Wastewater from Hospitals in Southern Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), 221-227. doi: 10.1089/mdr.2010.0013
- Figueiredo, S., Bonnin, R., Poirel, L., Duranteau, J., y Nordmann, P. (2011). Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clinical Microbiology and Infections*, 18(9), 907-913. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03708.x
- Figueiredo, D., Netto, K., Menezes, E., Pinto, R., Rezende, C., Martins, L., ... Bona, S. (2011). First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(3), 368-370. doi: 10.1590/S0074-02762011000300019
- Finley, R., Collignon, P., Larsson, D., McEwen, S., Li, Z., Gaze, W., ... Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, 57(5), 704-710. doi: 10.1093/cid/cit355
- Fonseca, E., Scheidegger, E., Freitas, F., Cipriano, R., y Vicente, A. (2013). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*_{OXA-23} gene. *BMC Microbiology*, 13(245), 1-7. doi: 10.1186/1471-2180-13-245.
- Franolić-Kukina, I., Bedenić, B., Budimir, A., Herljević, Z., Vraneš, J., y Higgins, P. (2011). Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in

a Croatian university hospital. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(10), 706-709. doi: 10.1016/j.ijid.2011.05.016

Fu, Y., Jiang, J., Zhou, H., Jiang, Y., Fu, Y., Yu, Y., y Zhou, Z. (2014). Characterization of a Novel Plasmid Type and Various Genetic Contexts of *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter* spp. from Multiple Cities in China. *PLoS One*, 9(1), 1-6. doi:10.1371/journal.pone.0084680

Gales, A., Castanheira, M., Jones, R., y Sader, H. (2012). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73, 354-360. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007

Gallo, G., y Puglia, A. (2013). Antibiotics and Resistance: a fatal Attraction. En Gualerzi, L. Brandi, A. Fabbretti, y C. Pon. (Eds.), *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=4TWyAAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Antibiotics:+Targets,+Mechanisms+and+Resistance&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Antibiotics%3A%20Targets%2C%20Mechanisms%20and%20Resistance&f=false

Ghamgosha, M., Shahrekizahedani, S., Kafilzadeh, F., Bameri, Z., Taheri, R., y Farnoosh, G. (2015). Metallo-beta-Lactamase VIM-1, SPM-1, and IMP-1 Genes Among Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Species Isolated in Zahedan, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(4), 1-5. doi: 10.5812/jjm.8(4)2015.17489

- Gillings, M (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 257-277. doi: 10.1128/MMBR.00056-13
- GIMP Team. (2016). *GIMP v. 2.08.16* [Software de edición de figuras]. Recuperado de <https://www.gimp.org/downloads/>
- Gionco, B., Pelayo, J., Venancio, E., Cayô, R., Gales, A., Carrara-Marroni, F. (2012). Detection of OXA-231, a new variante of *bla*_{OXA-143} in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2531-2539 doi: 10.1093/jac/dks223
- Girlich, D., Poirel, L., y Nordmann, P. (2010). First Isolation of the *bla*_{OXA-23} Carbapenemase Gene from an Environmental *Acinetobacter baumannii* Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 578-579. doi: 10.1128/AAC.00861-09
- Girlich, D., Damaceno, Q., Oliveira, A., y Nordmann, P. (2014). OXA-253, a Variant of the Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2976-2978. doi: 10.1128/AAAC.02640-13
- Girlich, D., y Nordmann, P. (2015). CHROMagar *Acinetobacter* medium for detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. strains from spiked stools. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 83(3), 234-236. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.023
- Goering, R., Dockrell, H., Zuckermall, M., Chiodini, P., y Roitt, I. (2013). *Mim's Medical Microbiology* (5ta Ed.). España: Elsevier.

- Goic-Barisic, I., Hrenovic, J., Kovacic, A., y Seruga, M. (2016). Emergence of Oxacilinases in Enviromental Carbapenem-Resitant *Acinetobacter baumannii* Associated with clinical Isolates. *Microbial Drug Resistance*, 00(00), 1-5. doi: 10.1089/mdr.2015.0275
- Gómez, A. (2011). *Presencia de carbapenemasas en Enterobacterias de muestras recolectadas de nueve hospitales de la ciudad de Quito, de mayo del 2009 a noviembre del 2010* (Tesis de pregrado). Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/4483/TESIS-PUCE-4297.pdf?sequence=1>
- Gómez, J., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Revista Española Quimioterapia*, 28(1), 1-9. Recuperado de <http://www.seq.es/seq/0214-3429/28/1/gomez.pdf>
- Gordon, N., y Wareham, D. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219-226. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024
- Green, M., y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th Ed.). Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grosso, F., Quinteira, S., Poirel, L., Novais, A., y Peixe, L. (2012). Role of Common *bla*_{OXA-24/OXA-40}-Carrying Platforms and Plasmids in the Spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* Species Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3969-3972. doi: 10.1128/AAC.06255-11

- Guitian, J., Giner, S., y López J. (2012). Importancia de la resistencia bacteriana en el paciente crónico. En M. Merino (Ed.), *La infección nosocomial. Resistencias bacterianas en pacientes crónicos*. Recuperado de <http://www.rclibros.es/pdf/Cap1.InfeccionNosocomial.pdf>
- Gupta, N., Gandham, N., Jadhav, S., y Mishra R. (2015). Isolation and identification of *Acinetobacter* species with special reference to antibiotic resistance. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 6(1), 159-162. doi: 10.4103/0976-9668.149116
- Hakemi, M., Hallajzadeh, M., Hashemi, A., Goudarzi, H., Tarhani, M., Sattarzadeh, M., ... Bazmi, F. (2014). Detection of Ambler class A, B and D β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 27(1), 8-13. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4150481/pdf/Ann-Burns-and-Fire-Disasters-27-8.pdf>
- Hammoudi, D., Ayoud, C., Hakime, N., Houmani, M., Barakat, A., Najjar, Z., ... Karam, D., (2014). Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. *International Journal of Infectious Diseases*, 36, 56-61. doi: 10.1016/j.ijid.2015.05.015
- Hamprecht, A., Poirel, L., Göttig, S., Seifert, H., Kaase, M., y Nordmann, P. (2013). Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 558-561. doi: 10.1093/jac/dks447

- Hart, M., Espinosa, F., Halley, M., Martínez, M., y Montes de Oca, Z. (2010). Resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de enero a marzo del 2010 en el Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". *Revista cubana de medicina*, 49(3), 218-227. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75232010000300001&script=sci_arttext
- Hartwell, L., Hood, L., Goldberg, M., Reynolds, A., y Silver, L. (2011). *Genetics. From genes to geneomes* (4th Ed.). New York: Editorial McGraw-Hill.
- Hayward, A., Fegan, N., Fegan, M., y Stirling, G. (2010). *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated *gamma*-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 756-770. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04471.x
- Hernández, A., García, E., Yagüe, G., y Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Revista Española de Quimioterapia*, 23(1), 12-19. Recuperado de <http://seq.es/seq/0214-3429/23/1/hernandez.pdf>
- Higgins, P., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., y Seifert, H. (2009). OXA-143, a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5035-5038. doi: 10.1128/AAC.00856-09
- Higgins, P., Dammhayn, C., Hackel, M., y Seifert, H. (2010). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 233-238. doi: 10.1093/jac/dkp428

- Higgins, P., Lehmann, M., Wisplinghoff, H., y Seifert, H. (2010). gyrB Multiplex PCR To Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4592-4594. doi: 10.1128/JCM.01765-10
- Higgins, P., Zander, E., y Seifert, H. (2013). Identification of a novel insertion sequence element associated with carbapenem resistance and the development of fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter radioresistens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 720-722. doi: 10.1093/jac/dks446
- Hrenovic, J., Goic-Barisic, I., Kazazic, S., Kovacic, A., Ganjto, M., y Tonkic, M. (2016). Carbapenem-Resistant Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Eurosurveillance*, 21(15), 1-10. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30195
- Hu, J., y Robinson, J. (2010). Systematic review of invasive *Acinetobacter* infections in children. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 21(2), 83-88. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2912103/pdf/idmm21083.pdf>
- IBM, (2015). *SPSS Statistics* (versión 23) [Software de cómputo]. Recuperado de <http://www-01.ibm.com/support/docview.wss?uid=swg27038407>
- Illuminati, C. (2015). *The New Dad Dictionary: Everything He Really Needs to Know-From A to Z*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=ItKYCAAQBAJ&pg=PA138&dq=antibioti>

cs+definition&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=antibiotics%20definition&f=false

Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos [CLSI]. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. Recuperado de http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf

Jeon, J., Lee, J., Lee, J., Park, K., Karim, A., Lee, C., ... Lee, S. (2015). Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9654-9692. doi: 10.3390/ijms16059654

Ji, S., Chen, Y., Ruan, Z., Fu, Y., Ji, J., Fu, Y., ... Yu, Y. (2014). Prevalence of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase genes in *Acinetobacter* spp. isolates in China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(6), 989-997. doi: 10.1007/s10096-013-2037-z

Jiménez, A. (2013). *Vigilancia microbiológica año 2011: una herramienta para el control de las infecciones intrahospitalarias (IIH), área de cuidados intensivos (ACI) HCAM* (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2815/1/109185.pdf>

Jouve, N. (2010). *Explorando los genes: Del big-bang a la nueva Biología*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=wxgToEfT1ZQC&pg=PA72&dq=mutaciones+en++las+bacterias&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=mutaciones%20en%20%20las%20bacterias&f=false

- Jung, J., y Park, W. (2015). *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2533-2548. doi: 10.1007/s00253-015-6439-y
- Kalin, G., Alp, E., Akin, A., Coskun, R., y Doganay, M. (2014). Comparison of colistin and colistin/sulbactam for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Infection*, 42(1), 37-42. doi: 10.1007/s15010-013-0495-y
- Kamolovit, W., Higgins, P., Paterson, D., y Seifert, H. (2014). Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 69 (4), 959-963. doi: 10.1093/jac/dkt480
- Karmostaj, A., Najari, S., y Hatef, A. (2013). Emergence of Tigecycline Resistant *Acinetobacter baumannii* from an Intensive Care Unit (ICU) in Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(3), 215-219. doi: 10.5812/jjm.4710
- Kaase, M., Szabados, F., Pfennigwerth, N., Anders, A., Geis, G., Pranada, A., ... Gatermann, S. (2014). Description of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 81-84. doi: 10.1093/jac/dkt325
- Kaase, M., Pfennigwerth, N., Lange, F., y Gatermann, S. (2015). Novel OXA-143 variant in a *Acinetobacter pittii* from Germany. (Unpublished). Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/949394529>
- Karah, N., Haldorsen, B., Hegstad, K., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., Samuelsen, Ø., ... Hjetland, R. (2011). Species identification and molecular characterization of

Acinetobacter spp. blood culture isolates from Norway. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1-7. doi: 10.1093/jac/dkq521

Kempf, M., y Rolain, J. (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: Clinical Impact and Therapeutic Options. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(2), 105-114. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004

Khorsi, K., Messai, Y., Hamidi, M., Ammari, H., y Bakour, R. (2015). High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like} and *bla*_{NDM-1} in Algiers hospitals. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(6), 438-446. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.05.011

Kim, C., Lee, Y., Lee, H., Woo, G., Song, W., Kim, M., ... Chong, Y. (2010). Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagnostic of Microbiology Infectious Disese*, 68(4), 432-438. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.014

Kim, Y., Roh, K., Lee, Y., Chung, H., Yum, J., Yong, D., Lee, K., y Chong, Y. (2013). Clonal change of *bla*_{SIM-1}-carrying *Acinetobacter* spp. from 2003 to 2008 in the hospital where it was initially discovered. *Microbial Drug Resistance*, 19(1), 37-41. doi: 10.1089/mdr.2012.0038

Koh, T., Sng, L., Yeng, G., Hsu, L., y Zhao, Y. (2007). IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 627-632. doi: 10.1093/jac/dkl544

Kostka, J., Prakash, O., Overholt, W., Green, S., Freyer, G., Canion, A., ... Huettel, M.

- (2011). Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962-7974. doi: 10.1128/AEM.05402-11
- Koraimann, G., y Wagner, M. (2014). Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(54), 1-7. doi: 10.3389/fcimb.2014.00054
- Krebs, J., Goldstein, E., y Kilpatrick, S. (2011). *Lewin's Genes X* (10a Ed.). Sudbury: Estados Unidos: Jones and Bartlett.
- Krebs, J., Goldstein, E., y Kilpatrick, S. (2012). *Lewin Genes: Fundamentos* (2a Ed.). México: Editorial Médica Panamericana.
- Krebs, J., Goldstein, E., y Kilpatrick, S. (2014). *Lewin's genes XI* (11a Ed.). Estados Unidos: Jones and Barlett.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K., (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 37(7), 1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Kuo, S., Yang, S., Lee, Y., Chuang, H., Chen, C., Chang, C., ... Fung, C. (2013). Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with new plasmid-borne *bla_{OXA-72}* in Taiwan. *BMC Infectious Diseases*, 13(319), 1-7. doi: 10.1186/1471-2334-13-319
- Labarca, J., Costa, M., Seas, C., y Guzmán-Blanco, M. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in

Latin America. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(2), 276-292. doi: 10.3109/1040841X.2014.940494

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A., Wertheim, L., Sumpradit, N., ... Cars, O. (2013). Antibiotic resistance - the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057-1098. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9

Lee, K., Kim, M., Choi, T., Cho, S., Lee, S., Whang, D., ... KONSAR Group. (2009). Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(6), 520-524. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.009

Lee, K., Kim, C., Hong, S., Choi, J., Song, S., Koh, E., ... Chong, Y. (2010). Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter* genomospecies 10 carrying two different metallo- β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3), 259-263. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.05.018

Lee, Y., Huang, Y., Tan, C., Kuo, Y., Liao, C., Lee, P., y Hsueh, P. (2011). *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), 1839-1846. doi:10.1093/jac/dkr200

Lee, Y., Kuo, S., Chiang, M., Yang, S., Chen, C., Chen, T., y Fung, C. (2012). Emergence of Carbapenem-Resistant Non-*baumannii* Species of *Acinetobacter* Harboring a *bla*_{OXA-51}-Like Gene That Is Intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1124-1127. doi: 10.1128/AAC.00622-11

- Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M., y Qi, R. (2010). Antibiotic Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3444-3451. doi:10.1128/AEM.02964-09
- Li, H., Liu, F., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, C., Chen, H., ... Wang, H. (2015). Evolution of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Revealed through Whole-Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1168-1176. doi: 10.1128/AAC.04609-14
- Liu, L., Ji, S., Ruan, Z., Fu, Y., Fu, Y., Wang, Y., y Yu, Y. (2015). Dissemination of *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter* spp. in China: Main Roles of Conjugative Plasmid pAZJ221 and Transposon Tn2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 1998-2005. doi: 10.1128/AAC.04574-14
- Loeffelholz, M., y Dong, J. (2013). PCR and its Variations. En Y. Tang, y C. Stratton (Eds.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (2^{da} Ed.). doi: 10.100/978-1-4614-3970-7
- Lopes, B., Al-Hassan, L., y Amyes, S. (2012). IS*Aba825* controls the expression of the chromosomal *bla*_{OXA-58-like} and the plasmid borne *bla*_{OXA-58} gene in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from the USA. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(11), 446-451. doi: 10.1111/j.14691.2012.03979.x
- Luo, Y., Yang, F., Mathieu, J., Mao, D., Wang, Q., y Alvarez, P. (2014). Proliferation of Multidrug-Resistant New Delhi Metallo- β -lactamase Genes in Municipal

- Wastewater Treatment Plants in Northern China. *Environmental Sciences & Technology Letters*, 1, 26-30. doi:10.1021/ez400152e
- Lupo, A., Coyne, S., y Ulrich, T. (2012). Origin and Evolution of Antibiotic Resistance: The Common Mechanisms of Emergence and Spread in Water Bodies. *Frontiers in Microbiology*, 3(18), 1-13. doi:10.3389/fmicb.2012.00018
- Maddison, W. P., y Maddison, D.R. (2014). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.01*. Recuperado de <http://mesquiteproject.org>
- Madhavan, H., y Murali, S. (2011). Mechanisms of Development of Antibiotic Resistance in Bacterial Among Clinical Specimens. *Journal of Clinical Biomedical science*, 1(2), 42-48. Recuperado de [http://jcbsonline.ac.in/Articles/jcbs%20-%201%20\(2\)_6-12.pdf](http://jcbsonline.ac.in/Articles/jcbs%20-%201%20(2)_6-12.pdf)
- Mahdi, O., Eklund, B., y Fisher, N. (2014). *Stenotrophomonas maltophilia*: Laboratory Culture and Maintenance. *Current Protocols in Microbiology*, 32(6), 1-9. doi: 10.1002/9780471729259.mc06f01s32
- Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben, S., Jouini, A., Cherif, H., ... Cherif, A. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnol*, 30(6), 723-733. doi: 10.1016/j.nbt.2013.03.004
- Malhotra, K., Walia, R., Aslam, S. y Goyal, M. (2012). Carbapenemases: The New Face of Antimicrobial Resistance. *Indian Journal of Clinical Practice*, 23(1), 6-8. Recuperado de <http://medind.nic.in/iaa/t12/i6/iaat12i6p6.pdf>

- Manchanda, V., Sanchaita, S., y Singh, N. (2010). Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 291-304. Recuperado de <http://www.jgid.org/article.asp?issn=0974-777X;year=2010;volume=2;issue=3;spage=291;epage=304;aulast=Manchanda>
- Mardis, E. (2013). Next-Generation Sequencing Platforms. *The Annual Review of Analytical Chemistry*, 6, 287-303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628
- Marinescu, F., Marutescu, L., Savin, I., y Lazar, V. (2015). Antibiotic resistance markers among Gram-negative isolates from wastewater and receiving rivers in South Romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(1), 10055-10069. Recuperado de http://www.rombio.eu/vol20nr1/--lucr%205%20Marinescu_Marutescu_receved_17.07.2013_ac%2020%20Oct%202014.pdf
- Martínez, R. (2013). *Salud y Enfermedad del Niño y del Adolescente*. (7ma Ed.). México: Editorial El Manual El Moderno, S.A. de C.V.
- Martínez, P., y Mattar, S. (2012). Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1*-bla_{OXA-23,51} and IS*Aba1*-bla_{ADC-7} genes in Monteria, Colombia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1274-1280. doi: 10.1590/S1517-83822012000400006
- Marsik, F. (2011). Antimicrobial Susceptibility Testing. En C. Mahon, D. Lehman, y G. Manuselis (Eds.), *Textbook of Diagnostic Microbiology* (Ed. 4^{ta}, pp. 276-314). Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=rdDsAwAAQBAJ&pg=PA267&dq=intrinsic>

+mechanism+of+antibiotic+resistance&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Matsui, M., Suzuki, S., Suzuki, M., Arakawa, Y., Shibayama, K. (2013). Rapid discrimination of *Acinetobacter baumannii* international clone II lineage by pyrosequencing SNP analyses of *bla*_{OXA-51-like} genes. *Journal of Microbiology Methods*, 94(2), 121-124. doi: 10.1016/j.mimet.2013.05.014

McDermott, P., y White, D. (2011). Antibiotic Mechanims of Action and Resistance. En C. Mahon, D. Lehman, y G. Manuselis (Eds.), *Textbook of Diagnostic Microbiology* (Ed. 4^{ta}, pp. 261-275). Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=rdDsAwAAQBAJ&pg=PA267&dq=intrinsic+mechanism+of+antibiotic+resistance&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Mesli, E., Berrazeq, M., Drissi, M., Bekkhoucha, S., y Rolain J. (2013). Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(9), 739-743. doi:10.1016/j.ijid.2013.02.024

Metzker, M. (2010). Sequencing technologies-the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46. doi: 10.1038/nrg2626

Microsoft. (2016). *Microsoft EXCEL* [Software de datos]. Recuperado de <https://support.office.com/home/contact>

Ministerio de Salud-Dirección General de Epidemiología de Perú. (2014). *Protocolo: estudio prevalencia de infecciones intrahospitalarias*. Recuperado de

http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/Protocolo%20Estudio%20de%20Prevalencia_DGE.pdf

Ministerio de Salud Pública [MSP]. (2009). *Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica*. Recuperado de http://instituciones.msp.gob.ec/dps/cotopaxi/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=44

Ministerio de Salud Pública. (2015). *Sistema de vigilancia y control de las infecciones intrahospitalarias, sivein 2007, 2008, 2009, 2010, 2011*. SlideShare. Recuperado de <http://www.slideshare.net/manuelita1018/sivein-analisis-total20072011>

Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C., Gniadkowski, M., ... Cantón, R. (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical and Microbiology Infections*, 16(2), 112-122. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x

Montealegre, M., Maya, J., Correa, A., Espinal, P., Mojica, M., Ruiz, S., ... Villegas, V. (2012). First Identification of OXA-72 Carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3996-3998. doi: 10.1128/AAC.05628-11

Moore, J., Moore, P., Millar, C., Goldsmith, C., Loughrey, A., Rooney, P., y Rao, J. (2010). The presence of antibiotic resistant bacteria along the River Lagan. *Agricultural Water Management*, 98(1), 217-221. doi: 10.1016/j.agwat.2010.09.001

Moran-Gilad, J., Adler, A., Schwartz, D., Navon-Venezia, S., y Carmeli, Y. (2014). Laboratory evaluation of different agar media for isolation of carbapenem-resistant

Acinetobacter spp. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(11), 1909-1913. doi: 1007/s10096-014-2159-y

Moreno, K., (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica LXX*, 608, 599-605. Recuperado de <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>

Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J., Couce, M., Cocho, J. (2013). A glimpse into past, presente, and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1, 3-22. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.04.024

Mosqueda, N., Gato, E., Roca, I., López, M., Ruíz, C., Fernández, F., ... Tomas, M. (2014). Characterization of plasmids carrying the *bla*_{OXA-24/40} carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2629-2633 doi:10.1093/jac/dku179

Mostachio, A., Levin, A., Rizek, C., Rossi, F., Zerbini, J., y Costa, S. (2012). High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9(5), 396-401. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.021

Moubareck, C., Brémont, S., Conroy, M., Courvalin, P., y Lambert, T. (2009). GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3579-3581. doi: 10.1128/AAC.00072-09

Mugnier, P., Poirel, L., Naas, T., y Nordmann, P. (2010). Worldwide Dissemination of the *bla*_{OXA-23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 35-40. doi: 10.3201/eid1601.090852

- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2014). *Microbiología Médica* (7^a Ed.). España, Barcelona: Elsevier.
- Naas, T., y Nordmann, P. (2010). *Acinetobacter* and β -Lactams. En P. Courvalin, R. Leclecq, y L. Rice (Eds.), *Antibiogram* (pp. 407-419). Canada: Eska publishing AMS Press.
- Narciso-da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., Svensson-Stadler, L., y Manaia, C. (2013). Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 329-340. doi: 10.1007/s00253-012-4190-1
- Narciso-da-Rocha, C., y Manaia, C. (2016). Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in Surface water. *Science of the Total Environment*, 563-564, 1-0. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.062
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., y Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7), 524-534. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.011
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Van der Reijden, T., Deschaght, P., Passet, V., ... Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in Microbiology*, 162(4), 393-404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006

- Nemec, A., Krizova¹, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., y Higgins, P. (2016). *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 934-942. doi: 10.1099/ij.s.0.000043
- Nodarse R. y Fuerte, H. (2015). Identificación fenotípica de cepas de *Acinetobacter* circulantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 44(1), 33-40. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v44n1/mil05115.pdf>
- Nordmann, P., Naas, T., y Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emergy Infectious Diseases*, 17(10), 1791-1798. doi: 10.3201/eid1710.110655
- Noyd, R., Krueger, J., y Hill, K. (2014). *Biology: Organisms and Adaptations, Media Update* (Enhanced Edition) Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=U9dwCwAAQBAJ&pg=PT615&dq=plasmids+biology+genetic+2014&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=plasmids%20biology%20genetic%202014&f=false
- Nowak, P., Paluchowska, P., y Budak, A. (2012). Distribution of *bla_{oxa}* genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiologica*, 35(3), 317-25. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842601>
- Núñez, L., Tornello, C., Puentes, N., y Moretton, J. (2012). Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. *Revista Ambiente &*

Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, 7(1), 235-243. doi: 10.4136/ambi-agua.638.

Núñez, T., Rodríguez, C., Cañarte, G., Nastro, M., Balderrama, N., Dabos, L., ... Famiglietti, A. (2016). Outbreak of *bla*_{OXA-72}-producing *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Chemotherapy*, 13, 1-4. doi:10.1080/1120009X.2016.1158936

Opazo-Capurro, A. (2014). *Mobilome and antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Edinburgo. Recuperado de <https://www.era.lib.ed.ac.uk/handle/1842/10024>

Opazo, A., Domínguez, M., Bello, H., Amyes, S., y González-Rocha, G. (2012). OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6(4), 311-316. doi: 10.3855/jidc.2310

Opazo, A., Sonnevend, A., Lopes, B., Hamouda, A., Ghazawi, A., Pal, T., y Amyes, S. (2012). Plasmid-encoded PER-7 β -lactamase responsible for ceftazidime resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated in the United Arab Emirates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1619-1622. doi:10.1093/jac/dks087

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2010). *Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii (MDRAB)*. Recuperado de http://www.wpro.who.int/mediacentre/factsheets/fs_20101102/en/

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015). *Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria*. Recuperado de http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/

- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016). *Una atención más limpia es una atención más segura*. Recuperado de <http://www.who.int/gpsc/background/es/>
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2010). *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención en salud*. Recuperado de http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/SPA_Modulo_I_Final.pdf?ua=1
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2012). *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención en salud: Módulo III-Información para gerentes y directivos*. Recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19272&Itemid=
- Orozco-Rico, M. (2011). *Acinetobacter baumannii* multidrogo-resistente y pandrogo-resistente: perspectiva, mecanismos de resistencia y tratamiento. *Revista Médica MD*, 3(1), 44-49. Recuperado de http://www.revistamedicamd.com/sites/default/files/revistas/078_-_acinetobacter_baumannii.pdf
- Özdemir, H., Kendirli, T., Ergün, H., Çiftçi, E., Tapisiz, A., Güriz, H., ... Doğru, U. (2011). Nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a pediatric intensive care unit in Turkey. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 53(3), 255-260. Recuperado de http://www.turkishjournalpediatrics.org/pediatrics/pdf/pdf_TJP_919.pdf
- Palzkill, T. (2014). Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277, 91-104. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x

- Papp-Wallace, Endimiani, A., Taracila, M., y Bonomo, R. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943-4960. doi:10.1128/AAC.00296-11
- Patwardhan, A., Ray, S., y Roy, A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2(2), 1-9. doi: 10.4172/2329-9002.1000131
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265-267. Recuperado de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v18n2/pdf/a23v18n2.pdf>
- Peña-Castro, J., Gregorio-Ramírez, O., y Barrera-Figueroa, B. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, 24(2), 237-246. doi: 10.1016/S0187-893X(13)72468-6
- Perez, L., Zurita, I., Pérez, N., Patiño, N., y Calvimonte, O. (2010). Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención. *Revista Científica de Ciencias Médicas*, 13(2), 90-94. Recuperado de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332010000200009
- Pérez-Cano, H., y Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica*, 4(3), 186-191. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>

- Périchon, B., Goussard, S., Walewski, V., Krizova, L., Cerqueira, G., Murphy, C., ... Courvalin, P. (2014). Identification of 50 Class D β -lactamses and 65 *Acinetobacter* Derived Cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 936-949. doi: 10.1128/AAC.01261-13
- Perilli, M., Sabatini, A., Pontieri, E., Celenza, G., Segatore, B., Bottoni, C., ... Amicosante, G. (2015). OXA-23 Carbapenemase in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Type: First Identification in L'Aquila Hospital (Italy). *Microbial Drug Resistance*, 21(1), 97-101. doi: 10.1089/mdr.2014.0056
- Pierce, B. (2012). *Genetics: A conceptual Approach* (4^{ta} Ed.). United States of America: W.H. Freeman and Company.
- Poirel, L., Bonnin, R., y Nordman, P. (2011). Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life*, 63(12), 1061-1067. doi: 10.1002/iub.532
- Poirel, L., Naas, T., y Nordmann, P. (2010). Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 24-38. doi: 10.1128/AAC.01512-08
- Poirel, L., Magalhaes, M., Lopes, M., y Nordmann, P. (2004). Molecular Analysis of Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{SPM-1}-Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1406-1409. doi: 10.1128/AAC.48.4.1406-1409.2004

- Poonia, S., Singh, T., y Tsering, D. (2014). Antibiotic Susceptibility Profile of Bacteria Isolated from Natural Sources of Water from Rural Areas of East Sikkim. *Indian Journal of Community Medicine*, 39(3), 156-160. doi: 10.4103/0970-0218.137152
- Prado, A., Arias, N., Chávez, M., Cabrera, C., y Gómez, R. (2014). Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali. *Biomédica*, 34(1), 101-107. doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1666
- Promega. (2012). *GoTaq® Green Master Mix*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/gotaq%20green%20master%20mix%20protocol.pdf>
- Pujol, M., y Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(2), 108-113. doi: 10.1016/j.eimc.2013.01.001
- Punpanich, W., Nithitamsakun, N., Treeratweeraphong, V., y Suntarattiwong, P. (2012). Risk factors for carbapenem non-susceptibility and mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia in children. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(11), e811-e815. doi: 10.1016/j.ijid.2012.07.006
- Qu, J., Du, Y., Yu, R., y Lü, X. (2016). The First Outbreak Caused by *Acinetobacter baumannii* ST208 and ST195 in China. *BioMed Research International*, 1-6. doi: 10.1155/2016/9254907
- Quiñones, D., Carvajal, I., Perez, Y., Hart, M., Perez, J., Garcia, R., Kobayashi, N. (2015). High prevalence of *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter* spp. and detection of *bla*_{NDM-1}

in *A. soli* in Cuba: report from National Surveillance Program (2010–2012). *New Microbes New Infect.*, 7, 52-56. doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.002

Rafei, R., Dabboussi, F., Hamze, M., Eveillard, M., Lemarié, C., Mallat, H., ... Kempf, M. (2014). First report of *bla*_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *International Journal of Infectious Diseases*, 21, 21-23. doi: 10.1016/j.ijid.2014.01.004

Raka, L., Mulliqi-Osmani, G., Begolli, L., Kurti, A., Lila, G., Bajrami, R., y Jaka-Loxha, A. (2013). *Acinetobacter*. En B. Silpi (Ed.), *Infection Control* (pp. 83-92). doi: 10.5772/55618

Rambach, A. (2014). *CHROMagarTM Acinetobacter*. Recuperado de <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-acinetobacter-focus-on-acinetobacter-50.html#.V227WLh94dV>

Rambach, A. (2015). *Instructions For Use*. Recuperado de http://www.chromagar.com/fichiers/14430877791417077822NT_EXT_055_NOTICE_AC_V9.pdf

Rambaut, A. (2014). *FigTree v.1.4.2*. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rambaut, A. Suchard, M., y Drummond, A. (2013). *Tracer v.1.6*. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

Randolph, A., y McCulloh, R. (2014). Pediatric sepsis. *Virulence*, 5(1), 179-189. doi: 10.4161/viru.27045

- Ribeiro, V., Falci, D., Rozales, F., Barth, A., y Zavascki, A. (2014). Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Infections Disease*, 18(2), 231-232. doi: 10.1016/j.bjid.2013.12.002
- Rice, L. (2012). Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance of β -lactams, Glicopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(2), 198-208. doi: 10.1016/j.jmayocp.2011.12.003
- Rodríguez, C., Nastro, M., Weyland, B., Losada, M., Vay, C., y Famiglietti, A. (2010). Bacteriemias causadas por *Acinetobacter* spp. y resistencia a carbapenemes. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 44(2), 243-248. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572010000200007&script=sci_arttext
- Roldos, M. (2015). *Planta de tratamiento de aguas residuales en Pomasqui* (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4403>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542. doi: 10.1093/sysbio/sys029
- Rosenthal, V., Bijie, H., Maki, D., Mehta, Y., Apisarnthanarak, A., Medeiros, E., ... Jayatilake, K. (2012). International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 Countries, for 2004-2009. *American Journal of Infection Control*, 40, 396-407. doi: 10.1016/j.ajic.2011.05.020

- Routray, A., Lavanya, P., Soniya, R., y Madhavan, R. (2013). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA and NDM-1 carbapenemases in *Acinetobacter*. *Journal of Pharmacy Research*, 7(4), 324-326. doi: 10.1016/j.jopr.2013.03.026
- Royer, S., Souza, A., Seki, L., Gomes, T., Amaral, P., da Fonseca, D., ... Marques, R. (2015). Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(4), 350-357. doi:10.1016/j.bjid.2015.03.009
- Rozas, J., Librado, P., Sánchez-DelBarrio, J., Messeguer, X., y Rozas, R. (2010). *DnaSP version 5.10.1*. Recuperado de <http://www.ub.edu/dnasp/>
- Rubtsova, Y., Ulyashova, M., Bachmann, T., Schmid, R., y Egorov, A. (2010). Multiparametric Determination of Genes and Their Point Mutations for Identification of Beta-Lactamases. *Biochemistry*, 75(13), 1628-1649. doi: 10.1134/S0006297910130080
- Russell, P., Hertz, P., y McMillan, B. (2015). *Biology: The Dynamic Science*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=s3tTCwAAQBAJ&pg=PT390&dq=bacterial+transposons&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=bacterial%20transposons&f=false
- Safari, M., Nejad, A. S. M., Bahador, A., Jafari, R., & Alikhani, M. Y. (2015). Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from

patients of intensive care units (ICU). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 424-429. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.01.004

Saavedra, S., Cayô, R., Gales, A., Leal, A., y Saavedra, C. (2014). Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(6), 678-680. doi: 10.1016/j.bjid.2014.05.017.

Sen, B., y Joshi, S. (2015). Studies on *Acinetobacter baumannii* involving multiple mechanisms of carbapenem resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 619-629. doi: 10.1111/jam.13037

Sevillano, E., Fernández, E., Bustamante, Z., Zabalaga, S., Rosales, I., Umaman, A., y Gallego, L. (2012) Emergence and clonal dissemination of carbapenem-hydrolysing OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bolivia. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 80-84. doi: 10.1099/jmm.0.032722-0

Shahcheraghi, F., Abbasalipour, M., Feizabadi, M., Ebrahimipour, G., y Akbari, N. (2011). Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(2), 68-74. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279807/pdf/IJM-3-068.pdf>

Shapiro, B., Rambaut, A., y Drummond, A. (2006). Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 7-9. doi: 10.1093/molbev/msj021

- Sheikh, A., Rostami, S., Jolodar, A., Tabatabaiefar, M., Khorvash, F., Saki, A., ... Sheikhi, R. (2014). Detection of metallo-beta lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(11), 1-6. doi: 10.5812/jjm.12289
- Shrestha, S., Tada, T., Shrestha, B., Ohara, H., Kirikae, T., Rijal, B., ... Shrerchand, J. (2015). Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with special reference to metallo- β -lactamase production from the hospitalized patients in a tertiary care hospital in Nepal. *Journal of Institute of Medicine*, 37(3), 1-10. Recuperado de <http://www.jiom.com.np/index.php/jiomjournal/article/view/809/782>
- Shrestha, G., Tamang, S., Raj, H., Shrestha, P., Keyal, N., Acharya, S., ... Shilpakar, S. (2016). Colistin and tigecycline for management of external ventricular device-related ventriculitis due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 7(3), 450-452. doi: 10.4103/0976-3147.176194
- Silva, L., Grosso, F., Souza, C., y Peixe, L. (2016). Exploring non-hospital-related settings in Angola reveals new *Acinetobacter* reservoirs for *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58}. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1-2. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.003
- Song, W., Lee, J., Kim, T., Park, M., Kim, H., y Kim, J. (2013). Modified CHROMagar *Acinetobacter* Medium for Direct Detection of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Strains in Nasal and Rectal Swab Samples. *Annals of Laboratory Medicine*, 33(3), 193-195. doi: 10.3343/alm.2013.33.3.193

- Srivastava, S. (2013). *Genetics of Bacteria*. doi: 10.1007/978-81-322-1090-0
- Stokes, H., y Gillings, M. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 790-819. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x
- Sun, J., Deng, Z., y Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254-267. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090
- Sun, J., Perng, C., Chan, M., Morita, Y., Lin, J., Su, C., ... Chiueh, T. (2012). A Truncated AdeS Kinase Protein Generated by IS*AbaI* Insertion Correlates with Tigecycline Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*, 7(11), 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0049534
- Sun, Y., Liu, Q., Chen, S., Song, Y., Liu, J., Guo, X., ... Feng, S. (2014). Characterization and Plasmid Elimination of NDM-1-Producing *Acinetobacter calcoaceticus* from China. *PLoS One*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0106555
- Sun, F., Zhou, D., Wang, Q., Feng, J., Feng, W., Luo, W., ... Xia, P. (2016). The first report of detecting the *bla*_{SIM-2} gene and determining the complete sequence of the SIM-encoding plasmid. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(4), 347–351. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.001
- Sydnor, E., y Perl, T. (2011). Hospital Epidemiology and infection Control in Acute-Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 141-173. doi:10.1128/CMR.00027-10

- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Dahal, R., Mishra, S., Ohara, H., Shimada, K., ... Pokhrel, B. (2013). Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(4), 372-374. doi: 10.106/j.j.ijantimicag.2013.06.014
- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Dahal, R., Sah, M., Ohara, H., Shimada, K., ... Pokhrel, B. (2014). NDM-1 Metallo- β -Lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. *BMC infectious diseases*, 14(1), 1-5. doi: 10.1186/1471-2334-14-56
- Taitt, C., Leski, T., Stockelman, M., Craft, D., Zurawski, D., Kirkup, B., y Vora, G. (2014) Antimicrobial resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates taken from military treatment facilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 767-781. doi: 10.1128/AAC.01897-13
- Tängdén, T., Adler, M., Cars, O., Sandegren, L., y Lowdin, E. (2013). Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an *in vitro* pharmacokinetic model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(6), 1319–1326. doi: 10.1093/jac/dkt044
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., y Hameed, S. (2014). Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 1-7. doi: 10.1155/2014/541340

- Teixeira, A., Martins, A., Barin, J., Hermes, D., Pitt, C., y Barth, A. (2013). First Report of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter nosocomialis* Isolates Harboring IS*AbaI-bla*_{OXA-23} Genes in Latin America. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(8), 2739-2741. doi: 10.1128/JCM.00469-13
- Thirapanmethee, K. (2012). Extended Spectrum β -Lactamases: Critical Tools of Bacterial Resistance. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, 39(1), 1-8. Recuperado de http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/journal/_files/2012-39-1_01-08.pdf
- Tien, N., You, B., Chang, H., Lin, H., Lee, C., Chung, T., ... Chang, C. (2012). Comparison of Genospecies and Antimicrobial Resistance Profiles of Isolates in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex from Various Clinical Specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6267-6271. doi: 10.1128/AAC.01304-12
- Todorova, B., Velinov, T., Ivanov, I., Dobрева, E., y Kantardjiev, T. (2014). First detection of OXA-24 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bulgaria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1427-1430. doi:10.1007/s11274-013-1562-3
- Torres, V. (2015). *Determinación de características fenotípicas y genotípicas de carbapenemasas en el Hospital Pediátrico Baca Ortiz de Quito en el año 2013* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/10161>

Tsakiridou, E., Makris, D., Daniil, Z., Manoulakas, E., Chatzipantazi, V., Vlachos, O., ...

Zakynthinos, E. (2014). *Acinetobacter baumannii* Infection in Prior ICU Bed Occupants Is an Independent Risk Factor for Subsequent Cases of Ventilator-Associated Pneumonia. *BioMed Research International*, 2014, 1-7. doi: 10.1155/2014/193516

Turton, J., Gabriel, S., Valderrey, C., Kaufmann, M., y Pitt, T. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infections*, 13(8), 807-815. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01759.x

Turton, J., Hyde, R., Martin, K., y Shah, J. (2012). Genes Encoding OXA-134-Like Enzymes Are Found in *Acinetobacter lwoffii* and *A. schindleri* and Can Be Used for Identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 1019-1022. doi: 10.1128/JCM.06173-11

USB corporation. (2005). *USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup*. Recuperado http://media.affymetrix.com/support/technical/usb/brief_proto/78200B.pdf

Vahaboglu, H., Budak, F., Kasap, M., Gacar, G., Torol, S., Karadenizli, A., ... Eroglu, C. (2006). High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(3), 537-542. doi: 10.1093/jac/dkl273

Vanegas-Múnera, J., Roncancio-Villamil, G., y Jiménez-Quiceno, J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Revista CES*

Medicina, 28(2), 233-246. Recuperado de
<http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v28n2/v28n2a08.pdf>

- Venter, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T., y Ma, S. (2015). RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 6(377), 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2015.00377
- Verma, V., Testero, S., Amini, K., Wei, W., Liu, J., Balachandran, N., ... Golemi-Kotra, D. (2011). Hydrolytic Mechanism of OXA-58 Enzyme, a Carbapenem-hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 37292-37303. doi: 10.1074/jbc.M111.280115
- Visca, P., Seifert, H., y Towner, K. (2011). *Acinetobacter* Infection – an Emerging Threat to Human Health. *IUBMB Life*, 63(12), 1048-1054. doi: 10.1002/iub.534
- Walsh, T. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3), 8-14. doi: 10.1016/S0924-8579(10)70004-2
- Walsh, T., Weeks, J., Livermore, D., y Toleman M. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Disease*, 11(5), 355-362. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7
- Wang, Y., Wu, C., Zhang, Q., Qi, J., Liu, H., Wang, H., ... Shen, J. (2012). Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of Food Animal Origin. *PLoS One*, 5(5), 1-6. doi: 10.1371/journal.pone.0037152

- Wang, J., Ruan, Z., Feng, Y., Fu, Y., Jiang, Y., Wang, H., y Yu, Y. (2014). Species Distribution of Clinical *Acinetobacter* Isolates Revealed by Different Identification Techniques. *PLoS One*, 9(8), 1-7. doi: 10.1371/journal.pone.0104882
- Wang, D., Yan, D., Hou, W., Zeng, X., Qi, Y., y Chen, J. (2015). Characterization of *bla*_{OXA-23} gene regions in isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(3), 284-290. doi:10.1016/j.jmii.2014.01.007
- Wei, W. J., Yang, H. F., Ye, Y., y Li, J. B. (2015). New Delhi Metallo-β-Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern. *Chinese Medical Journal*, 128(14), 1969-1976. doi: 10.4103/0366-6999.160566
- Wendel, A., Brodner, A., Widra, S., Ressina, S., Hendrich, B., y Pfeffer, K. (2013). Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae during a long-term outbreak. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 57, 5162-5165. doi: 10.1128/AAC.00118-13.
- Wendel, A., y MacKenzie, C. (2015). Characterization of a Novel Metallo-β-lactamase Variant, GIM-2, from a Clinical Isolate of *Enterobacter cloacae* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1824-1825. doi: 10.1128/AAC.05062-14
- Werneck, J., Picão, R., Carvalhaes, C., Cardoso, J., y Gales, A. (2011) OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(2), 452-454. doi: 10.1093/jac/dkq462

- WHONET. (2014). *Protocolo de trabajo Red Whonet Argentina*. Recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf>
- WHONET. (2015). *Red Nacional de Resistencia a antibióticos Ecuador: Presentación talleres de Hospitales RAM, Quito, Marzo 2015*. Recuperado de <https://sites.google.com/site/whonetecuador/home/datos-vigilancia>
- WHONET. (2016). *WHO Collaborating Centre for Surveillance of Antimicrobial Resistance*. Recuperado de <http://www.whonet.org/software.html>
- Wong, E., Mohd, M., BtMansor, M., Anbazhagan, D, Ong, S., Sekaran, S. (2009). Disruption of *adeB* gene has a greater effect on resistance to meropenems than *adeA* gene in *Acinetobacter* spp. isolated from University Malaya Medical Centre. 50(8), 822-826. Recuperado de <http://smj.sma.org.sg/5008/5008a13.pdf>
- Woodford, N., Ellington, M., Coelho, J., Turton, J., Ward, M., Brown S., ... Livermore, D. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(4), 351-353. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.02.004
- Wu, W., He, Y., Lu, J., Lu, Y., Wu, J., y Liu, Y. (2015). Transition of *bla*_{OXA-58-like} to *bla*_{OXA-23-like} in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Southern China: An 8-Year Study. *PLoS One*, 10(9), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0137174
- Xin, F., Cai, D., Sun, Y., Guo, D., Wu, Z., y Jiang, D. (2014). Exploring the diversity of *Acinetobacter* populations in river water with genus-specific primers and probes. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(2), 51-58. doi: 10.2323/jgam.60.51

- Yang, Z., y Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Review Genetics*, 13, 303-314. doi: 10.1038/nrg3186
- Yang, D., Liang, H., Gao, H., Wang, X., y Wang, Y. (2015). Analysis of drug-resistant gene detection of blaOXA-like genes from *Acinetobacter baumannii*. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 18999-19004. doi: 10.4238/2015
- Yang, Q., y Rui, Y. (2016). Two Multiplex Real-Time PCR Assays to Detect and Differentiate *Acinetobacter baumannii* and Non- *baumannii* *Acinetobacter* spp. Carrying bla_{NDM}, blaOXA-23-Like, blaOXA-40-Like, blaOXA-51-Like, and blaOXA-58-Like Genes. *PLoS One*, 11(7), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0158958
- Yungán, J. (2010). *Estudio de la calidad de agua en los afluentes de la microcuenca del río blanco para determinar las causas de la degradación y alternativas de manejo* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/579/1/13T0660%20YUNG%C3%81N%20JOS%C3%89.pdf>
- Zander, E., Bonnin, R., Seifert, H., y Higgins, P. (2014). Characterization of blaOXA-143 Variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2704-2708. doi: 10.1128/AAC.02618-13
- Zhang, Y., Marrs, C., Simon, C., y Xi, C. (2009). Wastewater treatment contribute to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Science of the Total Environment*, 407, 3702-3706. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.13

- Zhang, C., Qiu, S., Wang, Y., Qi, L., Hao, R., Liu, X., ... Song, H. (2013). Higher Isolation of NDM-1 Producing *Acinetobacter baumannii* from the Sewage of the Hospitals in Beijing. *PLoS One*, 8 (6), 1-6. doi: 10.1371/journal.pone.0064857
- Zhao, W., y Hu, Z. (2015). Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and IS CR elements in Gram-negative bacteria. *Future microbiology*, 10(5), 873-887. doi: 10.2217/fmb.15.18
- Zhou, Z., Du, X., Wang, L., Yang, Q., Fu, Y., y Yu, Y. (2011). Clinical Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baylyi* Strain Coharboring *bla*_{SIM-1} and *bla*_{OXA-23} from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5347-5349. doi: 10.1128/AAC.00425-11
- Zuñiga, A., Chávez, M., Gómez, R., Cabrera, C., Corral, R., y López, R. (2010). Relación entre virulencia y resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii*. *Ciencias Biomédicas*, 8(14), 121-240. Recuperado de http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_ARTREVIS1.pdf

9. ANEXOS

Anexo 1. Datos de los aislados clínicos obtenidos del INSPI-Quito periodo enero-diciembre 2015. En la tabla se detalla el código del aislado, el tipo de muestra, servicio, la edad y sexo del paciente a la que corresponde cada muestra. Zona 9 representa al código de la ciudad de Quito, UCI: unidad de cuidados intensivos.

Código del aislado	Edad	Sexo	Localización	Tipo de muestra	Servicio
15-0014	2 años	Femenino	Zona 9	Orina	Emergencia
15-0107	60 años	Masculino	Zona 9	Desconocido	Desconocido
15-0115	5 meses	Masculino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0117	2 años	Femenino	Zona 9	Secreción	Desconocido
15-0122	39 años	Femenino	Zona 9	Absceso	Cirugía general
15-0176	45 años	Masculino	Zona 9	Secreción	Medicina interna
15-0181	12 años	Masculino	Zona 9	Herida	Infectología
15-0184	15 años	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0252	15 años	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0255	7 años	Femenino	Zona 9	Catéter	Pediatría
15-0259	1 año	Masculino	Zona 9	Orina	Desconocido
15-0499	52 días	Masculino	Zona 9	Catéter	UCI

Anexo 1. Continuación...

Código del aislado	Edad	Sexo	Localización	Tipo de muestra	Servicio
15-0500	1 año	Femenino	Zona 9	Piel	Unidad de quemados
15-0502	2 años	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	Neonatología
15-0540	14 años	Masculino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0577	6 años	Masculino	Zona 9	Secreción traqueal	Cirugía general
15-0578	13 años	Masculino	Zona 9	Sangre	Cirugía general
15-0579	13 años	Masculino	Zona 9	Catéter	Cirugía general
15-0580	6 años	Femenino	Zona 9	Orina	UCI
15-0581	8 años	Masculino	Zona 9	Sangre	UCI
15-0582	1 año	Masculino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0589	7 años	Femenino	Zona 9	Piel	Unidad de quemados
15-0590	1 año	Masculino	Zona 9	Catéter central	Cirugía general
15-0591	82 años	Masculino	Zona 9	Espujo	Traumatología
15-0608	14 años	Masculino	Zona 9	Catéter	UCI
15-0610	2 años	Masculino	Zona 9	Absceso	Unidad de quemados
15-0659	4 años	Femenino	Zona 9	Secreción	Traumatología
15-0669	1 año	Masculino	Zona 9	Sangre	Desconocido

Anexo 1. Continuación...

Código del aislado	Edad	Sexo	Localización	Tipo de muestra	Servicio
15-0687	13 años	Masculino	Zona 9	Piel	Desconocido
15-0690	5 años	Masculino	Zona 9	Secreción traqueal	Desconocido
15-0691	5 meses	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	Desconocido
15-0780	13 años	Femenino	Zona 9	Sangre	Cirugía general
15-0795	82 años	Masculino	Zona 9	Espujo	Desconocido
15-0853	37 años	Femenino	Zona 9	Absceso	Traumatología
15-0900	13 años	Masculino	Zona 9	Espujo	Cirugía general
15-0923	4 años	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0927	-	----	Zona 9	Desconocido	UCI
15-0973	4 meses	Femenino	Zona 9	Catéter	Neonatología
15-0985	5 meses	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0989	1 año	Masculino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-0997	9 años	Femenino	Zona 9	Líquido pleural	Cardiología
15-1004	1 año	Masculino	Zona 9	Absceso	Traumatología
15-1064	6 años	Masculino	Zona 9	Espujo	Infectología
15-1108	6 años	Femenino	Zona 9	Piel	Unidad de quemados

Anexo 1. Continuación...

Código del aislado	Edad	Sexo	Localización	Tipo de muestra	Servicio
15-1109	13 años	Masculino	Zona 9	Herida de cadera	Traumatología
15-1119	3 años	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-1138	3 meses	Femenino	Zona 9	Herida	Pediatría
15-1139	2 años	Masculino	Zona 9	Líquido cefaloraquídeo	UCI
15-1175	78 años	Masculino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-1352	42 años	Femenino	Zona 9	Secreción traqueal	UCI
15-1367	66 años	Femenino	Zona 9	Herida	Consulta externa
15-1368	37 años	Femenino	Zona 9	Absceso	Consulta externa

Anexo 2. Protocolo de *Global Sewage Surveillance Project*

El protocolo está disponible en el Laboratorio del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI-Quito.

1. Llenar 1 litro de agua residual en cada uno de los contenedores - una por día. Dejar un poco de espacio para permitir que el agua residual se expanda durante la congelación.
 - a. Si se toman muestras por duplicado. Recoger cada muestra de agua residual en un intervalo de no más de 24 horas si es posible. Si no es posible se debe recoger con al menos 5 minutos de intervalo entre cada una de las muestras individuales de aproximadamente 300 ml para cada muestra, asegurando la parte aleatoria lo más posible.
 - b. Recoger cada muestra de agua a partir de la mitad de la corriente de las aguas residuales.
 - c. Registrar la temperatura de donde fue recogida la muestra.
2. Cerrar los contenedores con la tapa correspondiente y asegurar para evitar fugas. La muestra debe mantenerse lo más fresca posible y se transportará al laboratorio en una funda ziploc independiente y a 4°C dentro de las 8 horas de colección. Limpiar la superficie de los recipientes limpios con alcohol.

Anexo 3. Datos de muestras ambientales colectadas de cinco ríos de la ciudad de Quito-Ecuador 2016. En la tabla se detalla el código de la muestra, la temperatura, el pH, las coordenadas geográficas y las características organolépticas de cada muestra. Acrónimos, RMO: río Monjas, RS: río San Pedro, RMA: río Machángara, RP: río Pita, RG: río Guayllamba.

Código	Temperatura	pH	Altura (m)	Coordenadas geográficas	Características	
					Olor	Color
RMO1	11°C	6,5	2 651	S 00.09022°, W 078.48711°	Fétido	Turbio
RMO2	12°C	6,0	2 434	S 00.05142°, W 078.45193°	Fétido	Transparente
RMO3	12°C	6,5	2 457	S 00.05704°, W 078.45284°	Fétido	Oscuro
RMO4	13°C	6,5	2 399	S 00.03986°, W 078.45027°	Rancio	Oscuro
RMO5	12°C	6,5	2 385	S 00.03072°, W 078.44983	Fétido	Transparente
RMO6	12°C	6,5	2 348	S 00.01246°, W 078.44088	Fétido	Oscuro
RS1	12°C	6,5	2 605	S 00.37205°, W 078.50685°	Rancio	Transparente
RS2	12°C	7,0	2 492	S 00. 32932°, W 078.45959°	Sin olor	Lúcido
RS3	12°C	7,0	2 488	S 00.32381°, W 078.45861°	Fétido	Turbio
RS4	12°C	6,5	2 474	S 00.30353°, W 078.46048°	Rancio	Turbio
RS5	12°C	7,0	2 474	S 00.30968°, W 078.45405°	Rancio	Turbio
RS6	12°C	6,5	2 350	S 00.01610°, W 078.02659	Rancio	Transparente
RMA1	12°C	6,5	2 231	S 00.18534°, W 078.41715°	Rancio	Turbio
RMA2	11°C	6,5	2 500	S 00.20905°, W 078.47659°	Fétido	Turbio

Anexo 3. Continuación....

Código	Temperatura	pH	Altura (m)	Coordenadas geográficas	Características	
					Olor	Color
RMA3	12°C	7,0	2 659	S 00.22196°, W 078.48650	Fétido	Oscuro con restos vegetales
RMA4	11°C	6,5	2 800	S 00.24386°, W 078.52479°	Rancio	Turbio
RMA5	12°C	6,5	2 822	S 00.25095°, W 078.52441°	Fétido	Turbio
RMA6	11°C	7,0	2 815	S 00.25688°, W 078.52592°	Rancio	Turbio
RP1	11°C	6,5	2 496	S 00.30941°, W 078.44335°	Rancio	Transparente
RP2	12°C	6,5	2 509	S 0031.1571°, W 078.43359°	Rancio	Transparente
RP3	10°C	6,5	2 510	S 00.31623°, W 078.43304°	Rancio	Transparente
RP4	11°C	6,5	2 550	S 00.34720°, W 078.4767°	Rancio	Transparente
RP5	12°C	6,5	2 560	S 00.34867°, W 078.42632°	Rancio	Transparente
RP6	12°C	6,5	2 591	S 00.35605°, W 078.42100	Rancio	Transparente
RG1	13°C	6,5	1 939	S 00.071655°, W 078.37490°	Rancio	Oscuro
RG2	13°C	6,5	1 935	S 00.0651°, W 078.37190°	Sin olor	Transparente
RG3	13°C	6,5	1 920	S 00.06862°, W 078.37289°	Sin olor	Transparente

Anexo 4. Puntos de corte de los antibióticos empleados en el presente estudio de acuerdo a los lineamientos del CLSI. La tabla describe el nombre del antibiótico, la concentración de cada disco de antibiótico y la interpretación del diámetro de inhibición; Acrónimos, S: sensible, I: intermedio y R: resistente.

Antibiótico	Concentración del disco	Interpretación del diámetro		
		S	I	R
Ampicilina/sulbactam	20 µg	≥ 15	12–14	≤ 11
Ceftazidima	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14
Ciprofloxacina	10 µg	≥ 21	16–20	≤ 15
Imipenem	10 µg	≥ 22	19–21	≤ 18
Meropenem	10 µg	≥ 18	15–17	≤ 14
Gentamicina	10 µg	≥ 15	13–14	≤ 12
Amikacina	30 µg	≥ 17	15–16	≤ 14
Cefepime	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14
Ácido nalidíxico	30 µg	≥ 19	14–18	≤ 13
Trimetoprim/sulfametoxazol	25 µg	≥ 16	11–15	≤ 10
Piperacilina/tazobactam	110 µg	≥ 21	18–20	≤ 17
Tobramicina	30 µg	≥ 15	13–14	≤ 12

Anexo 5. Lista de *primers* empleados en el presente estudio. En la tabla se indica el nombre del *primer*, las secuencias de cada *primer forward* y *reverse*, el tamaño esperado y la referencia de donde se obtuvo las secuencias.

<i>Primers</i>	Secuencia	Tamaño	Referencia
SIMF	TACAAGGGATTTCGGCATCG	570 pb	Ellington et al., 2007
SIMR	TAAGGCCTGTTCCCATGTG		
GESF	ATGCGCTTCATTACGCAC	863 pb	Opazo, Sonnevend et al., 2012
GESR	AACTCATCCTGAGCACGGAC		
SPMF	AAAATCTGGGTACGCAAACG	271 pb	Ellington et al., 2007
SPMR	ACATTATCCGCTGGAACAGG		
GIMF	TCGACACACCTTGGTCTGAA	477 pb	Ellington et al., 2007
GIMR	AACTTCCAACCTTTGCCATGC		
OXA-23F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501 pb	Woodford et al., 2006
OXA-23R	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
OXA-24F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246 pb	Woodford et al., 2006
OXA-24R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
OXA-51F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353 pb	Woodford et al., 2006
OXA-51R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA-58F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599 pb	Woodford et al., 2006
OXA-58R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
OXA-143F	TTCTGTCAGTGCATGCTCATC	728 pb	Opazo-Capurro, 2014
OXA-143R	CAGGCATTCTTGCTTCATT		

Anexo 6. Secuencias obtenidas del *GenBank* utilizadas para los análisis filogenéticos de cuatro genes de resistencia *bla*_{OXA}. En la tabla se indica el nombre del gen, el nombre de las especies de cada gen, las variantes de cada gen, el código de acceso *GenBank* y la referencia de las secuencias.

Gen	Especie	Variante	Código	Referencias
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>Acinetobacter pittii</i>	OXA-499	KT964029.1	Kaase et al., 2015
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>Acinetobacter pittii</i>	OXA-255	KC479325.2	Zander et al., 2014
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-143	GQ861437.1	Higgins et al., 2009
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-253	KF824909.1	Girlich et al., 2014
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-231	JQ676953.1	Gionco et al., 2012
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-182	HM640278.2	Kim et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>Acinetobacter baylyi</i>	OXA-72	FJ157355.1	Lee et al., 2009
<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>Providencia rettgeri</i>	OXA-24	AB857844.1	Tada et al., 2014
<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-24	AB825955.1	Tada et al., 2013
<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-139	AM991978.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>Acinetobacter pittii</i>	OXA-207	JQ838185.1	Cayô et al., 2012
<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-72	KP190117.1	Núñez et al., 2016
<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-33	AY082394.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	LC100116.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	OXA-23	JQ326202.1	Higgins et al., 2013
<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	OXA-23	KP881350.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>Acinetobacter indicus</i>	OXA-23	KU833219.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Genoma	LT594095.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-432	NG049719.1	No publicado

Anexo 6. Continuación.....

Gen	Especie	Variante	Código	Referencia
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-94	NG049835.1	Koh et al., 2007
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-259	NG049554.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	OXA-196	HQ425494.1	Lee et al., 2012
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	OXA-318	NG049437.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	OXA-194	HQ425492.1	Lee et al., 2012
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-508	KU596972.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-480	KR872296.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-425	KM588353.1	Li et al., 2015
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-254	AB781687.1	Matsui et al., 2013
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-88	NG049828.1	Koh et al., 2007
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-316	KF057033.1	Taitt et a., 2014
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-433	KM979380.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-70	AY750912.1	Brown y Amyes, 2005
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-91	NG049832.1	Koh et al., 2007
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-77	AY949202.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-93	DQ519087.1	Koh et al., 2007
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	EU525848.1	Turton et al., 2007
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-86	DQ149247.1	Vahaboglu et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-67	DQ191200.1	No publicado
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-64	AY750907.1	Brown y Amyes, 2005
<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	KR922890.1	No publicado

Anexo 6. Continuación...

Gen	Especie	Variante	Código	Referencia
<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-100	AM231720.2	No publicado
<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-344	KJ780075.1	No publicado
<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-381	KJ135344.1	No publicado
<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-242	JX025022.1	Higgins et al., 2013
<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-180	HM570036.1	Karah et al., 2011
<i>bla_{OXA-58}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-58	JQ409994.1	No publicado
<i>bla_{OXA-10}</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OXA-10	GU367339.1	No publicado

Anexo 7. Perfil de susceptibilidad de los diferentes aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. La tabla indica el código de la muestra, los distintos discos utilizados en el estudio. Acrónimos, MEM: meropenem, IMP: imipenem, TOB: tobramicina, SAM: ampicilina/sulbactam, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidíxico, SXT: trimetropim/sulfametoxazol, AMK: amikacina, FEP: cefepime, TZP: piperacilina/tazobactam.

Código del aislado	Antibióticos											
	MEM	IPM	TOB	SAM	CAZ	CIP	GEN	NAL	SXT	AMK	FEP	TZP
15-0014	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0107	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0115	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0117	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0122	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0176	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0181	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0184	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0252	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0255	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0259	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0499	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Anexo 7. Continuación....

Código del aislado	Antibióticos											
	MEM	IPM	TOB	SAM	CAZ	CIP	GEN	NAL	SXT	AMK	FEP	TZP
15-0500	R	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R
15-0502	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0540	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0577	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0578	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0579	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
15-0580	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0581	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0582	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0589	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0590	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
15-0591	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0608	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
15-0610	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0659	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R
15-0669	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Anexo 7. Continuación....

Código del aislado	Antibióticos											
	MEM	IPM	TOB	SAM	CAZ	CIP	GEN	NAL	SXT	AMK	FEP	TZP
15-0687	R	R	S	I	S	R	I	R	I	I	R	R
15-0690	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0691	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0780	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0795	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0853	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0900	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
15-0923	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0927	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0973	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0985	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0989	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-0997	R	R	S	R	R	S	S	I	S	I	S	R
15-1004	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
15-1064	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-1108	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Anexo 7. Continuación....

Código del aislado	Antibióticos											
	MEM	IPM	TOB	SAM	CAZ	CIP	GEN	NAL	SXT	AMK	FEP	TZP
15-1109	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-1119	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-1138	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-1139	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-1175	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-1352	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
15-1367	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15-1368	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Total de resistentes	52	52	11	49	51	49	45	50	48	48	51	52

Anexo 8. Perfil de susceptibilidad de los diferentes aislados de *Acinetobacter* spp. obtenidos de cuatro ríos de la ciudad de Quito. La tabla detalla el código de la muestra, los distintos discos utilizados en el estudio. Acrónimos, MEM: meropenem, IMP: imipenem, TOB: tobramicina, SAM: ampicilina/sulbactam, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, NAL: ácido nalidíxico, SXT: trimetropim/sulfametoxazol, AMK: amikacina, FEP: cefepime, TZP: piperacilina/tazobactam, RS: río San Pedro, RMA: río Machángara, RP: río Pita, RMO: río Monjas.

Código de las muestras	Antibióticos											
	MEM	IPM	TOB	SAM	CAZ	CIP	GEN	NAL	SXT	AMK	FEP	TZP
RS3a	I	I	S	S	I	I	S	I	S	R	I	I
RS3b	I	I	S	S	I	I	S	I	S	R	I	I
RMA3b	I	R	S	S	I	I	S	R	I	I	I	I
RMA3c	I	I	S	S	I	I	S	I	S	I	I	I
RMA2	I	R	S	S	I	I	S	I	I	I	I	I
RP2	I	I	S	S	I	I	S	I	S	I	I	I
RMO1a	I	R	S	S	R	I	S	I	I	I	I	I
RMO1b	I	I	S	S	I	I	S	I	S	I	I	I
RMO2	I	R	S	S	R	I	S	I	I	I	I	I
RMA3a	I	R	S	S	R	I	I	R	I	R	I	I
Total de resistentes	0	5	0	0	3	0	0	2	0	3	0	0

Anexo 9. Cuantificación de ADN de aislados clínicos procedentes de cuatro hospitales de la ciudad de Quito. La tabla indica el código del aislado, la concentración de ADN medida en nanogramos (ng) por micro litro (μ l), 260/280: muestra la relación de contaminación por proteínas o ARN, 260/230: constituye la relación de contaminación por compuestos propios de la extracción.

Código del aislado	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
15-107	97,1	2,18	1,16
15-115	183	1,9	0,72
15-117	89,1	1,89	0,8
15-122	88,7	1,86	0,65
15-176	62,5	1,85	0,64
15-181	86,6	1,89	0,74
15-184	88,5	1,75	0,73
15-252	67	1,98	0,97
15-255	62,8	1,91	0,78
15-259	134,5	2,01	1,08
15-499	93,4	1,95	0,73
15-500	112,3	2,08	0,82
15-502	340,8	1,68	0,57
15-540	81,1	2,04	0,85
15-577	79	2,02	0,82
15-578	66,5	2	0,78
15-579	104	1,93	0,73
15-580	122,1	1,95	0,73
15-581	57,4	2,04	0,75
15-582	50	1,97	0,85
15-589	60,6	1,92	0,82
15-590	64,5	1,86	0,75
15-591	126,1	1,92	0,98

Anexo 9. Continuación....

Código del aislado	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
15-608	81,6	1,9	0,72
15-610	64,1	2,04	0,83
15-659	432,3	2	1,09
15-669	395,8	2,07	1,31
15-687	105,6	1,94	0,74
15-690	118,6	1,92	0,87
15-691	244,5	2,06	1,32
15-780	430,3	1,82	0,87
15-795	160,6	1,94	0,98
15-853	-4,6	3,31	2,98
15-900	420,9	2	1,22
15-923	142,9	1,9	0,83
15-927	139,8	1,76	0,56
15-973	15,5	1,82	0,31
15-985	79,1	1,97	0,82
15-989	58	1,84	0,6
15-997	220,1	2,05	1,28
15-1004	133,2	1,83	0,72
15-1014	65,7	1,88	0,67
15-1064	65,3	1,89	0,66
15-1108	440,6	1,89	0,7
15-1109	62	1,93	0,68
15-1119	229,2	1,79	0,69
15-1138	295,8	1,59	0,58
15-1139	163,1	1,91	0,83
15-1175	312,2	1,72	0,59
15-1352	406,9	1,9	0,91
15-1367	1257,1	1,66	1,1
15-1368	166,6	1,84	0,81

Anexo 10. Cuantificación de ADN de aislados ambientales procedentes de cuatro ríos de la ciudad de Quito. La tabla indica el código del aislado, la concentración de ADN medida en nanogramos (ng) por micro litro (μ l), 260/280: constituye la relación de contaminación por proteínas o ARN, 260/230: muestra la relación de contaminación por compuestos propios de la extracción.

Código del aislado	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
RSAA	268,2	2,07	0,82
RSAb	179	2,03	0,74
RMA3b	214,5	1,94	0,77
RMA3C	154,5	2,13	0,75
RMA2	371,8	1,86	0,9
RP2	330	2,04	0,85
RMO1a	321,8	2,14	0,81
RMO1b	230,1	2,13	0,73
RMO2	286,8	2,11	0,82
RMA3a	325,6	2,05	0,89

Anexo 11. Genes de resistencia identificados en los diferentes aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. La tabla indica el código de la muestra, los distintos genes de resistencia probados en el estudio. Los resultados de PCR se encuentran expresados como positivos (+) y negativos (-).

Código del aislado	Genes de resistencia								
	metalo- β -lactamasas				serin- β -lactamasas				
	<i>bla</i> _{SIM}	<i>bla</i> _{GIM}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-143}
15-0014	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0115	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0107	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0117	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0122	-	-	+	-	+	+	-	-	-
15-0176	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0181	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0184	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0252	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0255	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0259	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0499	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0500	-	-	-	-	+	+	-	+	-

Anexo 11. Continuación....

Código del aislado	Genes de resistencia								
	metalo- β -lactamasas				serin- β -lactamasas				
	<i>bla</i> _{SIM}	<i>bla</i> _{GIM}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-143}
15-0502	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0540	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0577	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0578	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0579	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0580	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0581	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0582	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0589	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0590	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0591	-	-	+	-	+	+	-	-	-
15-0608	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0610	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-0659	-	-	-	-	+	+	+	-	-
15-0669	-	-	-	+	+	+	-	-	-
15-0687	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Anexo 11. Continuación....

Código del aislado	Genes de resistencia								
	metalo- β -lactamasas				serin- β -lactamasas				
	<i>bla</i> _{SIM}	<i>bla</i> _{GIM}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-143}
15-0690	-	-	+	+	+	+	-	-	-
15-0691	-	-	-	+	+	+	+	-	-
15-0780	-	-	+	-	+	+	-	-	-
15-0795	-	-	+	-	+	+	-	+	-
15-0853	-	-	+	+	+	+	-	+	-
15-0900	-	-	-	+	+	+	-	-	-
15-0923	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0927	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0973	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0985	-	-	-	-	+	+	+	-	-
15-0989	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-0997	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-1004	-	-	-	-	+	+	-	+	-
15-1064	-	-	-	-	+	+	+	+	-
15-1108	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-1109	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Anexo 11. Continuación....

Código del aislado	Genes de resistencia								
	metalo- β -lactamasas				serin- β -lactamasas				
	<i>bla</i> _{SIM}	<i>bla</i> _{GIM}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-143}
15-1119	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-1138	-	-	+	-	+	+	-	+	-
15-1139	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-1175	+	-	-	+	-	-	+	-	+
15-1352	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15-1367	-	-	-	-	+	+	+	+	-
15-1368	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Anexo 12. Genes de resistencia identificados en los diferentes aislados ambientales de *Acinetobacter* spp. La tabla detalla el código de la muestra, los distintos genes de resistencia probados en el estudio. Los resultados de PCR se encuentran expresados como positivos (+) y negativos (-).

Código del aislado	Genes de resistencia								
	metalo- β -lactamasas				serin- β -lactamasas				
	<i>bla</i> SIM	<i>bla</i> GIM	<i>bla</i> SPM	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> OXA-51	<i>bla</i> OXA-23	<i>bla</i> OXA-24	<i>bla</i> OXA-58	<i>bla</i> OXA-143
RS3a	-	-	+	-	+	-	-	-	-
RS3b	-	-	-	-	+	-	-	-	-
RMA3b	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RMA3c	-	-	+	-	+	-	-	-	-
RMA2	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RP2	-	-	-	-	+	-	-	-	-
RMO1a	-	-	-	-	+	-	-	-	-
RMO1b	-	-	-	-	+	-	-	-	-
RMO2	-	-	-	-	+	-	-	-	-
RMA3a	-	-	-	-	+	-	-	+	-